

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成26年11月13日(2014.11.13)

【公開番号】特開2013-83504(P2013-83504A)

【公開日】平成25年5月9日(2013.5.9)

【年通号数】公開・登録公報2013-022

【出願番号】特願2011-222635(P2011-222635)

【国際特許分類】

G 0 1 N	33/50	(2006.01)
A 6 1 Q	19/02	(2006.01)
A 6 1 K	8/97	(2006.01)
G 0 1 N	33/15	(2006.01)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
C 1 2 Q	1/34	(2006.01)

【F I】

G 0 1 N	33/50	Z N A Z
A 6 1 Q	19/02	
A 6 1 K	8/97	
G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50	P
G 0 1 N	33/50	Q
C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/68	A
C 1 2 Q	1/34	

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月1日(2014.10.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

プロアドレノメジュリンN-末端20ペプチド(PAMP: Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide)及び/又はアドレノメジュリン2/インテルメジン(ADM2/IMD: Adrenomedullin2/Intermedin)結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用を指標とする、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項2】

被験物質を細胞に添加することにより、前記被験物質のPAMP及び/又はADM2/IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する、請求項1に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であって、

被験物質を添加して培養した細胞の、PAMP結合受容体遺伝子発現量、ADM2/IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP結合受容体蛋白質発現量、ADM2/IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP結合受容体親和性、及びIMD結合受容体親和性からなる群より選ばれる少なくとも1種の物理量、及び被験物質を非添加の細胞の、前記物理量と同一種の物理量を測定する測定工程、及び

前記測定工程で得られた物理量を比較し、前記PAMP及び/又はADM2/IMD結合受容体を介

するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する評価工程、を含む、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項3】

被験物質を細胞に添加することにより、前記被験物質のPAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する、請求項1に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であって、

PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化因子を細胞に付与する活性化因子付与工程、及び

被験物質を添加して培養した細胞の、メラニン産生量、チロシナーゼの酵素活性、チロシナーゼ遺伝子発現量、c-AMP産生量、PAMP結合受容体遺伝子発現量、ADM2／IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP結合受容体蛋白質発現量、ADM2／IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP結合受容体親和性、及びIMD結合受容体親和性からなる群より選ばれる少なくとも1種の物理量、及び被験物質を非添加の細胞の、前記物理量と同一種の物理量を測定する測定工程、

前記測定工程で得られた物理量を比較し、前記PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する評価工程、を含む、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項4】

前記活性化因子付与工程が、前記測定工程の被験物質の添加前に行われる、請求項3に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項5】

前記活性化因子付与工程が、PAMPの添加及び／又はADM2／IMDの添加を含む、請求項3又は4に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項6】

前記PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体が、カルシトニン受容体様受容体(CRLR: Calcitonin receptor-like receptor)及び受容体活性化調節蛋白1～3(RAMP1～3: Receptor activity-modifying protein 1～3)のいずれか1種より形成される受容体、及びMrgX2受容体からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項1～5の何れか1項に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項7】

前記PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体遺伝子発現量が、CRLRmRNA、RAMPmRNA、及びMrgX2 mRNAからなる群より選択される少なくとも1種以上のmRNAの発現量である、請求項2～6の何れか1項に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項8】

メラノサイト単独培養、又はケラチノサイト及びメラノサイトの共培養系を使用する、請求項1～7の何れか1項に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項9】

前記評価工程において、前記測定工程で得られた物理量を比較し、被験物質を非添加の細胞から得られた物理量に比して被験物質を添加して培養した細胞から得られた物理量が減少した被験物質をPAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用があると判定する、請求項2～8の何れか1項に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項10】

PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用があると判定された被験物質をメラニン産生抑制剤として選択する、請求項9に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

【請求項11】

請求項1～10の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤を含有する、美白用組成物。

【請求項12】

皮膚外用剤である、請求項1_1に記載の美白用組成物。

【請求項1_3】

化粧料（但し、医薬部外品を含む）である、請求項1_1又は1_2に記載の美白用組成物。

【請求項1_4】

請求項1～10の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤を含有させる、美白組成物の設計方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】スクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、化粧料等に好適な、新規な作用機序に基づくメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法、該メラニン産生抑制剤を含有する美白用組成物、並びにその美白用組成物の設計方法に関するものである。尚、本発明の説明において、化粧料との用語は、医薬部外品を含むものとして定義する。

【背景技術】

【0002】

表皮に存在する色素細胞（メラノサイト）のメラニン産生が著しく亢進された皮膚症状としては、メラニン産生が一時的に亢進した日焼け等の色素沈着症状のほか、過剰又は慢性的なメラニン産生亢進により生じるしみ、そばかす、くすみ等の色素沈着異常が挙げられる。この様な色素沈着症状は、肌の美観の悪化、加齢の兆候として認識され、他人の見た目の印象に大きな影響を与えるため、肌に関するアンケート調査等を実施した場合には、必ず上位に位置付けられる肌トラブルである。

【0003】

これまでの色素沈着症状の発生・症状進行等の機序に関する研究により、メラニン産生は、皮膚刺激により産生される様々な情報伝達物質、サイトカイン等の生理活性物質により調節されていることが明らかにされている。さらに、前記の色素沈着に関する研究成果を基に様々な色素沈着予防又は改善作用を有する成分（美白剤）が創出され、化粧料等への応用が図られている。この様な美白剤としては、チロシナーゼ酵素に対する阻害作用を有するレゾルシン誘導体、アルブチン及びハイドロキノン誘導体、チロシナーゼ活性発現に必須な銅イオンをキレートするエラグ酸及びコウジ酸、 α -MSH (MSH : Melanocyte stimulating hormone) 阻害作用を有するマメ科クララ（苦参）より得られる植物抽出物（例えば、特許文献1を参照）、メラノサイトのデンドライド伸長抑制作用を有するスイカズラ科スイカズラより得られる植物抽出物（例えば、特許文献2を参照）、エンドセリン-1産生抑制作用を有するハヤトウリ果実抽出物（例えば、特許文献3を参照）等の美白剤が知られている。しかしながら、化粧料に配合されている従来の美白剤には、一定の色素沈着予防又は改善効果は認められるものの、使用者が望む高い美白効果、持続性が十分に得られているとは言い難い。これは、メラニン産生機構が依然として十分に解明されておらず、既知の作用機序に基づいた美白作用だけでは、その効果が十分でないためであると考えられる。更に、既存の美白剤には、安全性又は安定性に課題を有するものも存在した。

【0004】

185個のアミノ酸より構成されるアドレノメジュリンのアミノ酸プレプロホルモン（以下アミノ酸プレプロホルモンと記す）は、生体の多様な組織に存在することが確認され、酵素文献及びアミド化反応によりアドレノメジュリン（ADM : Adrenomedullin）等の生理活性ペプチドを生成することが知られている。アミノ酸プレプロホルモンより生合成さ

れる生理活性ペプチドとしては、アミノ酸プレプロホルモンのN末端領域より生成するプロアドレノメジュリンN-末端20ペプチド(PAMP: Proaderenomedullin N-terminal 20 peptide)が既に報告され、降圧作用などの薬理作用が知られている。また、アミノ酸プレプロホルモンより整合性されるADMと同様のカルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーに属し、類似性の高い構造を有するアドレノメジュリン2/インテルメジン(ADM 2 / IMD: Adrenomedullin 2 / Intermedin)も発見されている。さらに、PAMP又はADM 2 / IMDが結合し生理活性を発現する受容体としては、G蛋白質共役型のカルシトニン受容体様受容体(CRLR: Calcitonin receptor-like receptor)が存在することが報告されている(例えば、非特許文献1を参照)。CRLRは、細胞膜1回貫通蛋白質の受容体活性化調節蛋白1(RAMP 1: Receptor activity-modifying protein 1)と複合体を形成することによりカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP: Calcitonin gene-related peptide)受容体を、RAMP 1と構造的に類似するRAMP 2又はRAMP 3と複合体を形成することにより2種類のADM結合受容体を形成することが報告されている。また、PAMPが結合する受容体としては、MrgX 2受容体が報告されている(例えば、非特許文献2を参照)。ADM及びADM構造類似ペプチドが有する薬理作用としては、抗菌又は抗真菌作用による擦り傷、皮疹又は皮膚損傷を治癒する作用(例えば、特許文献4を参照)が報告されている。一方、表皮ケラチノサイトより産生される-メラノサイト刺激ホルモン、エンドセリン-1、一酸化窒素、塩基性線維芽細胞増殖因子、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子等のサイトカイン等が、メラノサイトに存在する各々のシグナル伝達系を介しメラニン産生量を増加させることは知られているが、PAMP及び/又はADM 2 / IMD結合受容体を介したシグナル伝達系によりメラニン産生量が調節されることは、発明者の知る限り報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2009-067804号公報

【特許文献2】特開2003-081747号公報

【特許文献3】特開2008-094737号公報

【特許文献4】特開2007-145850号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Roh J., Chang CL., Bhalla A., Klein C., Hsu SY., J Biol Chem., 2004 Feb 20; 279(8), 7264-74. Epub 2003 Nov 13.

【非特許文献2】Masakazu Kamohara et. al., Biochemical and Biophysical Research communications, 330, 1146-1152(2005)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、上記の様な状況を鑑みてなされたものであり、優れた美白成分の発見に繋がる技術を確立することを課題とする。特に、既知の作用機序による美白作用に着目することでは困難と考えられる、新規な作用機序に基づいた美白作用の発見と、かかる美白作用を評価し得る方法を確立することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意努力を重ねた結果、アミノ酸プレプロホルモンより合成されるPAMP、カルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーに属するADM 2 / IMDが、メラノサイトのPAMP及び/又はADM 2 / IMD結合受容体を介したシグナル伝達系(以下、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系)を活性化し、メラニン産生量を増加させる事實を発見した。即ち、従来知られているメラニン産生調節系とは異なる作用機序(PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系)を介しメラニン産生が制御されていることを明

らかにした。メラニン産生がPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系により制御されることは発明者の知る限り報告されていない。さらに、かかるメラニン産生機構が明らかとされていない以上、これを抑制する成分や方法についての検討も、積極的に行われてこなかったと言える。従って、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化を抑制することが出来る成分は、新たな作用機序を介したメラニン産生抑制剤となり得る。

【0009】

本発明者は、さらに鋭意努力を重ね、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化作用を抑制する成分を精度よく、効率的に評価し得る方法を確立した。さらに、かかる方法により評価した成分を含有した組成物が、色素沈着予防又は改善作用を発揮することを確認した。即ち、本発明は、以下に示す通りである。

<1> プロアドレノメジュリンN-末端20ペプチド (PAMP : Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide) 及び／又はアドレノメジュリン2／インテルメジン (ADM 2 / IMD : Adrenomedullin 2 / Intermedin) 結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用を指標とする、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<2> 被験物質を細胞に添加することにより、前記被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する、<1>に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であって、

前記被験物質添加前及び／又は添加後にPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化因子を付与した場合、及び前記被験物質を添加せずにPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化因子を付与した場合のメラニン産生量、チロシナーゼの酵素活性、チロシナーゼ遺伝子発現量、c-AMP産生量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はIMD結合受容体親和性を比較し、前記PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<3> 前記PAMP及び／又はADM 2 / IMD 結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化因子の付与が、PAMP添加、ADM 2 / IMD添加であることを特徴とする、<2>に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<4> 被験物質を細胞に添加することにより、前記被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達への不活性化作用を評価する、<1>に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であって、

前記被験物質を添加した場合、及び前記被験物質を添加しない場合のPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量又は結合受容体親和性を比較し、前記PAMP及び／又はADM 2 / IMD受容体結合を介するシグナル伝達系への不活性化作用を評価する、メラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<5> 前記PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体が、カルシトニン受容体様受容体 (CRLR : Calcitonin receptor - like receptor) と、受容体活性化調節蛋白1～3 (RAMP 1～3 : Receptor activity-modifying protein 1～3) より形成される受容体、又は、MrgX 2受容体である、<1>～<4>の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<6> 前記PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量が、CRLR及び／又はRAMP mRNA、MrgX 2 mRNAの少なくとも1種以上である、<3>～<5>の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<7> メラノサイト単独培養、又はケラチノサイト及びメラノサイトの共培養系を使用する、<1>～<6>の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法。

<8> <1>～<7>の何れかに記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤を含有する、美白用組成物。

<9> 皮膚外用剤である、<8>に記載の美白用組成物。

<10> 化粧料(但し、医薬部外品を含む)である、<8>又は<9>に記載の美白用組成物。

< 1 1 > < 1 > ~ < 7 > に記載のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法によりメラニン産生抑制作用を有すると判別された成分を含有させる、美白組成物の設計方法。

【発明の効果】

【0 0 1 0】

本発明によれば、従来明らかとされていなかったPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化作用によるメラニン産生量増加を抑制する新規なメラニン産生抑制剤を、精度よく、かつ簡便に選択することが出来る。また、かかるメラニン産生抑制剤を利用した美白用組成物、並びにその設計方法を提供することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0 0 1 1】

【図1】メラノサイトにおけるPAMP添加によるメラニン産生量及び細胞数変化検討の結果を示す図である。

【図2】メラノサイトにおけるADM 2 / IMD添加によるメラニン産生量及び細胞数変化の検討結果を示す図である。

【図3】メラノサイトを用いたPAMP添加によるRAMP1,RAMP3遺伝子発現変動の検討結果を示す図である。

【図4】メラノサイトを用いたADM2/IMD添加によるRAMP1,RAMP3遺伝子発現変動の検討結果を示す図である。

【図5】ケラチノサイトおよびメラノサイト共培養系を用いた紫外線照射によるメラニン産生量及び細胞数変化の検討結果を示す図である。

【図6】メラノサイトを用いたRAMP1遺伝子発現に対するオリーブエキスの効果の検討結果を示す図である。

【図7】メラノサイトを用いたRAMP1遺伝子発現に対するマジョラムエキスの効果の検討結果を示す図である。

【図8】メラノサイトを用いたRAMP1遺伝子発現に対するアルブチンの効果検討結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

以下に本発明の実施の形態について詳細に説明するが、本発明はこれらの内容に限定されるものではない。

【0 0 1 3】

<本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法>

本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を指標とするメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であることを特徴とする。PAMPは、アミノ酸プレプロホルモンのN末端領域より合成される生理活性ペプチドである。一方、ADM 2 / IMDは、アミノ酸プレプロホルモンより合成されるADMと同様のカルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーに属しADM類似構造を有するアミノ酸である。PAMP及びADM 2 / IMDにより発現する生理活性に関しては様々な研究がなされているが、解明されていない部分も多い。PAMP及びADM 2 / IMDが結合親和性を示す受容体としては、主に、カルシトニン受容体様受容体(CRLR)及び受容体活性化調節蛋白(RAMP 1 ~ 3)により形成される複合体受容体が知られている。PAMP及びADM 2 / IMDは、前記のCRLR及びRAMP 1 ~ 3により形成される3種類の受容体に対し親和性を示すことが明らかにされているが、特に、CRLR及びRAMP 1より形成される複合体受容体に対し高い受容体親和性を示す。また、PAMPが高い結合親和性を示す受容体としては、MrgX 2受容体の存在も報告されている。

【0 0 1 4】

本発明における「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体」としては、PAMP又はADM 2 / IMDが結合親和性を示す受容体であれば限定されない。かかる受容体の内、好ましいものを具体的に挙げれば、前述のCRLR及びRAMP 1 ~ 3により形成される複合体受容体、MrgX 2受容体が、さらに好ましいものとしては、CRLR及びRAMP 1より形成される複合体受容体が好

適なものとして例示出来る。

【0015】

本発明における「PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用」とは、PAMP又はADM 2 / IMDが結合する受容体に対し直接又は間接的に働き掛け、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を不活性化する作用を意味する。具体的には、直接又は間接的なPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体拮抗作用、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量を減少させる作用、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量を減少させる作用、c - AMP等のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の二次情報伝達物質を減少させる作用、及びメラニン産生に深く関与する生物活性を不活性化させる作用等が挙げられる。本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を指標とするメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法であるため、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用であることが明らかであれば、メラニン産生に関与する生物活性の不活性化によりメラニン産生抑制剤を判別することが可能である。

【0016】

本発明における「PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を指標とする」とは、即ち、メラニン産生抑制剤として評価される被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用に係る物理量を測定する工程を含み、かかる物理量を用い被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を直接的又は間接的に評価する工程を含むことを意味する。PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用に係る物理量とは、例えば、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体拮抗作用」、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量を減少させる作用」、又は「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量を減少させる作用」等の場合には、遺伝子発現量、蛋白質発現量又はPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性等が、「c - AMP等の二次的情報伝達物質を減少させる作用」の場合にはc - AMP等の二次的情報伝達物質量が該当する。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用によって生じていることが明らかな現象に係る物理量を測定する場合も、間接的にPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を評価していることになるため、これに含まれる。例えば、メラニン産生量、又はメラニン産生量に係るチロシナーゼの酵素活性、チロシナーゼ遺伝子発現量、チロシナーゼ酵素蛋白質発現量等を測定する場合がこれに該当する。

【0017】

PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を評価し得る物理量を測定する方法としては、ケラチノサイト及びメラノサイト等のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を有する細胞を用い、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体親和性、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、c - AMPなどの二次的情報伝達物質量等を測定する方法が好適なものとして例示出来る。

【0018】

「PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系への不活性化作用を指標」としメラニン産生抑制剤をスクリーニングするとは、被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMD シグナル伝達系への不活性化作用を評価し、その評価結果を基に、被験物質をメラニン産生抑制剤として判定又は選択することを意味する。例えば、被験物質にPAMP及び／又はADM 2 / IMD シグナル伝達系への不活性化作用があると評価された場合には、該被験物質にはメラニン産生抑制作用がある、即ちメラニン産生抑制剤となり得ると判定するほか、PAMP及び／又はADM 2 / IMD シグナル伝達系への不活性化作用について事前に評価基準を設けておき、その基準を超えた場合、当該被験物質にはメラニン産生抑制作用があると判定する等もこれに含まれる。さらに、複数の被験物質についてPAMP及び／又はADM 2 / IMD シグナル伝達系への不活性化作用を評価し、これらの作用を相対的に比較して、PAMP及び／又はADM 2 / IMD シグナル伝達系への不活性化作用がより高い被験物質が、より優れたメラニン産

生抑制剤であると判定することも、本発明のスクリーニング方法に含まれる。

【0019】

対象となる被験物質は、化合物、動植物由来の抽出物若しくはその分画精製物等の混合組成物等の何れであってもよく、植物由来の抽出物としては、自生若しくは生育された植物、漢方生薬原料等として販売されるものを用いた抽出物、市販（丸善製薬株式会社等）されている抽出物等が挙げられる。抽出操作を行う場合、植物部位は全草を用いるほか、植物体、地上部、根茎部、木幹部、葉部、莖部、花穂、花蕾等の部位のみを使用することができるが、予めこれらを粉碎或いは細切して抽出効率を向上させることが好ましい。抽出溶媒としては、水、エタノール、イソプロピルアルコール、ブタノールなどのアルコール類、1,3-ブタンジオール、ポリプロピレングリコールなどの多価アルコール類、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなどのエーテル類等の極性溶媒から選択される1種乃至は2種以上が好適なものとして例示出来る。具体的な抽出方法としては、例えば、植物体等の抽出に用いる部位乃至はその乾燥物1質量に対して、溶媒を1～30質量部加え、室温であれば数日間、沸点付近の温度であれば数時間浸漬し、室温まで冷却した後、所望により不溶物及び／又は溶媒除去し、カラムクロマトグラフィー等で分画精製する方法が挙げられる。

【0020】

上述の通り、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の活性化により、細胞のメラニン産生量が増加することは従来知られていなかった。「PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系への不活性化作用」とは、かかるメラニン産生機構を阻害する作用であり、この様な作用機序を介しメラニン産生抑制効果を発揮するメラニン産生抑制剤は、新規な作用機序に基づいたメラニン産生抑制作用であるとも言える。本発明は、かかる新規なメラニン産生抑制作用を判別し得るスクリーニング方法であり、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系への不活性化作用を指標とするものであれば特段限定されないが、以下に好適なスクリーニング方法を具体的に例示する。

【0021】

1) メラニン産生量を測定するスクリーニング方法

以下に説明するスクリーニング方法は、本発明の内、特に、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達によるメラニン産生機構を活性化した細胞に被験物質を添加し、細胞のメラニン産生量を測定することを特徴とするスクリーニング方法である。PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系を活性化することにより、細胞のメラニン産生量は増加する（図1及び図2）。従って、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系を活性化する条件を意図的に設定し（なるべくメラニン産生に影響するその他の因子を排除する）、その条件下における被験物質のメラニン産生に与える影響（メラニン産生抑制作用）を観測することで、実質上被験物質のPAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用を評価することになる。即ち、本スクリーニング方法は、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する工程、及びメラニン産生量を測定する工程を含むことが重要となる。

【0022】

本スクリーニング方法における具体的な工程を、以下に挙げる。

(i) 評価に使用する細胞に、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する

(ii) 被験物質を添加する（比較対照として被験物質を添加せずにPAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与した細胞も用意する）

(iii) 被験物質の添加及び非添加の場合のメラニン産生量を測定する

(iv) 測定したメラニン産生量を比較して、被験物質のPAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価する

(v) 測定したメラニン産生量、又は評価したメラニン産生抑制作用を、予め設定した基準に基づいて判定し、被験物質を判別する

【0023】

本スクリーニング方法の場合は、メラニン産生量を直接測定するため、特に、かかるメラニン産生がPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系に起因するものであることを定かにする条件が必要である。従って、上記(i)の工程、即ちPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する工程を含む。PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子の付与は、上記(ii)の工程における被験物質の添加前及び／又は添加後の何れであってもよいが、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を不活性化する作用発現機序を明確にする観点及びメラニン産生量の測定感度等の観点から、被験物質の添加前に行われることが好ましい。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化することが出来れば特段限定されないが、好ましいものとしては、PAMP、ADM 2 / IMDの添加等が挙げられる。

【0024】

上記(iii)の工程におけるメラニン産生量の測定は、メラニン産生量を測定することが出来る方法であれば特段限定されず、公知の方法を適宜用いることが出来る。さらにメラニン産生量との関係性が明らかにされている生理活性、例えば、c-AMP等の二次的情報伝達物質量、メラニン産生の律速酵素であるチロシナーゼの酵素活性、チロシナーゼ遺伝子発現量、チロシナーゼ酵素蛋白質発現量等によりメラニン産生量の測定は代替してもよい。

【0025】

本スクリーニング方法の場合は、メラニン産生量を直接測定する、即ちメラニン産生抑制作用を直接観測することになるため、その測定値を用い直接メラニン産生抑制剤を判別することも出来る。従って、(iv)の工程を必ずしも必要とするものではないが、例えば、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD添加時における被験物質の添加及び非添加のメラニン産生量の差」から「PAMP及び／又はADM 2 / IMD非添加時における被験物質の添加及び非添加のメラニン産生量の差」を引き、それを「被験物質添加時におけるPAMP及び／又はADM 2 / IMD添加及び非添加時のメラニン産生量の差」で割って百分率とした、以下の【数1】の計算式を用いてメラニン産生抑制作用を算出してもよい。この計算式によれば、PAMP及び／又はADM 2 / IMD添加により亢進したメラニン産生に対する被験物質の効果、メラニン産生抑制作用を好適に判断することが出来る。

【数1】

数1

$$\frac{\left[\frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(+)} - \frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(+)} \right] - \left[\frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(+)} - \frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(+)} \right]}{\left[\frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(+)\text{被験物質}(+)} - \frac{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(-)}{PAMP\text{及びADM}2/\text{IMD}(-)\text{被験物質}(+)} \right]} \times 100$$

また、メラニン産生抑制作用を算出するために用いる測定値も1種類に限定されず、メラニン産生量との関係性が明らかにされている複数種類の値を測定し、任意の処理方法によって算出してもよい。

【0026】

上記(v)の工程の判定に用いる基準も特に限定されず、必要とするメラニン産生抑制作用に基づいて適宜設定することが出来る。例えば、上記【数1】の計算式で計算する場合、メラニン産生抑制剤としては、その値は10%以上が好ましく、20%以上がさらに好ましい。かかる値を示すメラニン産生抑制剤を含有する組成物は、優れた色素沈着予防又は改善効果を発揮する。従って、判定に用いる基準も上記範囲に基づいて設定されることが好ましい。

【0027】

本スクリーニング方法の評価に使用する細胞は、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を有し、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化によるメラニン産生量が測定

可能な細胞であれば特段限定されないが、メラノサイトが好適なものとして例示出来る。また、スクリーニング系に使用可能な培養系としては、単独培養であっても共培養であってもよく、より好ましいものを具体的に挙げれば、メラノサイトの単独培養系、メラノサイト及びケラチノサイトの共培養系が好適なものとして例示出来る。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化する因子としては、PAMP、ADM 2 / IMD添加が好適に例示出来、両者を共に添加することも可能である。

【0028】

本スクリーニング方法には、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化した細胞を用いることも出来る。また、本スクリーニング方法のメラニン産生量を測定する細胞培養条件としては、前記細胞を培養するための通常の培地を使用することも出来るが、通常の培地よりメラニン産生に影響を与える成長因子等を除くことが好ましい。これにより、かかる細胞におけるPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介さないメラニン産生量変化の影響を減少させ、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化によるメラニン産生量変化を選択的、精度よく測定することが出来る。具体的には、通常のメラノサイト培養は、市販のメラニン細胞基礎培地（Medium 254、倉敷紡績株式会社）にメラニン細胞増殖添加剤（HMGS、倉敷紡績株式会社）を添加し使用するが、かかる細胞増殖促進剤の内、ウシ脳下垂体抽出液（BPE : Bovine Pituitary Extraction）、インスリンを除くことが好ましい。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子について前述の通りだが、その添加にあたっては、被験物質添加前又は添加後の何れに行ってもよい。

【0029】

以上に記載したスクリーニング方法（メラニン産生量を測定するスクリーニング方法）の内、特に、実施例1に記載されている方法が好ましい。即ち、PAMP又はADM 2 / IMD添加によりPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化したメラノサイトの単独培養系を用い、被験物質添加及び非添加時のメラニン産生量を測定し、[数1]の計算式を用いてメラニン産生抑制作用を算出する方法である。

【0030】

2) PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性を測定するスクリーニング方法

以下に説明するスクリーニング方法は、本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法の内、特にメラノサイト等のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を有する細胞に被験物質を添加し、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性などのPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を測定することを特徴とするスクリーニング方法である。

【0031】

本スクリーニング方法における具体的な工程を、以下に挙げる。

(i) 評価に使用する細胞（PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化した状態又は活性化していない状態のいずれでもよい）に、被験物質を添加する（比較対照として被験物質を添加していない細胞も用意する）

(ii) 被験物質の添加及び非添加の場合のPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性を測定する

(iii) 測定したPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性を比較し、被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価する

(iv) 評価したメラニン産生抑制作用を、予め設定した基準に基づいて判定し、被験物質を判別する

【0032】

本スクリーニング方法の場合は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化に係るPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性を測定するため、上記の1)メラニン産生量を測定するスクリーニング方法とは異なり、必ずしもPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系が活性化する条件を設定しなくてもよい。即ち、上記(i)の工程においては、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系が活性化されていない細胞、或いはPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系が活性化された細胞の何れを用いてもよく、さらに被験物質の添加後にPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与したものであってもよい。PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化する場合、その活性化因子は特段限定されないが、好ましいものとしては、例えば、PAMP、ADM 2 / IMD添加が挙げられる。

【0033】

上記(ii)の工程におけるPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体結合親和性の測定は、被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価すること出来るものであれば特段限定されないが、測定精度、操作の簡便性などの面よりPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量を測定することがより好ましい。また、前述の通り、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体」としては、CRLR及びRAMP 1～3より形成される複合体受容体が報告され、メラノサイトにおける存在も確認されている。また、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体」としては、MrgX 2受容体の存在も報告されている。このため、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用の指標としては、CRLR、RAMP 1～3、MrgX 2より選択される1種又は2種以上の遺伝子発現量を測定することが、さらに好ましくは、CRLR及び／又はRAMP 1の遺伝子発現量を測定することが好ましい。CRLR及びRAMP 1～3より形成される3種類の複合体受容体にPAMP及び／又はADM 2 / IMDが結合することにより、シグナル伝達系が活性化され、メラニン産生が亢進するが、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化により受容体発現量も増加する。CRLR及びRAMP 1～3、特に、CRLR及びRAMP 1との複合体受容体には、PAMP及び／又はADM 2 / IMDとの高い結合親和性が認められる。また、これら個々又は複数の遺伝子発現を同時に抑制できる作用は、効果的なPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用となり得る。即ち、遺伝子発現量として評価する上でも、これらの遺伝子発現量を測定することが特に好ましい。さらに、測定操作の簡便性、測定精度、再現性等から、PAMP及び／又はADM 2 / IMD 結合受容体mRNA発現量を測定することが好ましく、CRLRmRNA発現量、RAMP 1 mRNA発現量を測定することがさらに好ましい。

【0034】

PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量を測定する方法は特段限定されないが、以下の方法が好適に例示出来る。現在、遺伝子発現量を測定する方法には、mRNA発現量を測定可能なノーザンプロット法(northern blotting)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)法、リアルタイムPCR(Real time PCR)法、更には、リアルタイムPCR(Real time PCR)とRT - PCRを組み合わせた測定方法等が存在する。本発明においては、測定感度及び測定の簡便性などの面より、リアルタイムPCR法によってPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体mRNA発現量を測定することが好ましい。尚、上述の遺伝子発現量測定は、被験物質の添加、並びにPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系を活性化させる要因の影響を受けることなく精度よく、簡便に測定することが出来る。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体遺伝子発現量、取り分け、CRLRmRNA、RAMP 1 mRNA発現量は、市販の簡易測定キットを使用することにより簡便に行うことが出来る。例えば、QIAGEN社より販売されているRNeasy Plus Mini Kitを使用しmRNAを抽出し、Invitrogen社より販売されているSuperScript VILO cDNA synthesis Kitを用いてcDNA(プライマー配列は、非公開)を合成した後、リアルタイムPCR法により、目的とするCRLRmRNA、RAMP 1 mRNA発現量を測定することが出来る。

また、PAMP及びADM 2 / IMD結合受容体結合親和性は、例えば、非特許文献1に記載の方法に従って測定することが出来る。

【0035】

上記(iii)の工程における被験物質のPAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価する方法は特段限定されないが、例えば被験物質を添加したものをサンプル群、被験物質を添加しないものをコントロール群とした場合、以下の式を用いる方法が挙げられる。

【数2】

数2

$$\text{被験物質の PAMP 及び / 又は ADM2 / IMD シグナル伝達系の不活性化作用} = \frac{\text{コントロール群の遺伝子発現量、蛋白質発現量、結合受容体への結合親和性} - \text{サンプル群の遺伝子発現量、蛋白質発現量又は結合受容体結合親和性}}{\text{コントロール群の遺伝子発現量、蛋白質発現量又は結合受容体結合親和性}} \times 100$$

また、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価するために用いるPAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体蛋白質発現量、PAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体結合親和性も1種に限定されず、複数種類測定して、任意の処理方法によりPAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を算出してもよい。さらに、上記(ii)の工程において測定されたPAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体遺伝子発現量、PAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体蛋白質発現量を直接用い、スクリーニングを行ってもよく、上記(iii)の工程を必要としないものでもよい。

【0036】

上記(iv)の工程の判定に用いる基準も特に限定されず、目的に応じて適宜設定することができる。例えば、上記[数2]の計算式で計算する場合、メラニン産生抑制剤としては、その値は10%以上が好ましく、20%以上がさらに好ましい。かかる値を示すメラニン産生抑制剤を含有する組成物は、優れた色素沈着予防又は改善効果を発揮する。従って、判定に用いる基準も上記範囲に基づいて設定されることが好ましい。

【0037】

本スクリーニング方法の評価に使用する細胞は、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を有し、上述のPAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価可能な細胞であれば特段限定されない。また、かかる細胞としては、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を有する通常の細胞のほか、遺伝子導入等によりPAMP及び/又はADM 2 / IMD 結合受容体を過剰発現させた細胞等も好適なものとして例示出来る。また、本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法には、通常の培養条件により培養した細胞を用いることも出来るし、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化した細胞を用いることも出来る。かかる細胞の培養条件としては、単独培養であっても共培養であってもよく、特にメラノサイトの単独培養、メラノサイト及びケラチノサイト共培養系が好適に例示出来る。さらに、本スクリーニング法におけるPAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化要因としては、PAMP、ADM 2 / IMD添加等が好ましい。また、前記PAMP及びADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化は、被験物質添加前又は添加後の何れに行ってもよい。

【0038】

3) c - AMP産生量を測定するスクリーニング方法

以下に説明するスクリーニング方法は、本発明の内、特にメラノサイト等の細胞に被験物質を添加し、PAMP及び/又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化の指標となるc - AMPなどの細胞内情報伝達物質量変化を測定することを特徴とするメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法である。PAMP及び/又はADM 2 / IMD結合受容体は、G - 蛋白質共役型受容体に分類されるため、その活性化度合い(不活性化度合い)をc - AMP等の二次情報伝達物

質產生量により把握することが出来る。c - AMP產生量は、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体以外の受容体にも影響されるため、PAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化に係るc - AMP產生を特異的に観測できる条件を設定することが必要である。即ち、本スクリーニング方法は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する工程、及びc - AMPを測定する工程を含むことが重要となる。

【0039】

本スクリーニング方法における具体的な工程を、以下に挙げる。

- (i) 評価に使用する細胞に、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する
- (ii) 被験物質を添加する（比較対照として被験物質を添加せずPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与した細胞も用意する）
- (iii) 被験物質の添加及び非添加の場合のc - AMP產生量を測定する
- (iv) 測定したc - AMP產生量を比較して、被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価する
- (v) 測定したc - AMP產生量、又は評価したc - AMP產生抑制作用を、予め設定した基準に基づいて判定し、被験物質を判別する

【0040】

上述したように、本スクリーニング方法の場合は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化に係るc - AMP產生を特異的に観測できる条件を設定することが必要である。従って、上記(i)の工程、即ちPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子を付与する工程を含む。PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子の付与は、上記(ii)の工程における被験物質の添加前及び／又は添加後の何れであってもよいが、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を不活性化する作用発現機序を明確にする観点から、被験物質の添加前に行われることが好ましい。また、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の活性化因子は、PAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化することが出来れば特段限定されないが、PAMP、ADM 2 / IMD添加が好ましい。

【0041】

上記(iii)の工程におけるc - AMP產生量を測定する方法は、特段限定されず、市販のc - AMP測定キットを用い、公知の方法を適用して測定することができる。

【0042】

上記(iv)の工程における被験物質のPAMP及び／又はADM 2 / IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価する方法は特段限定されないが、例えば、「PAMP及び／又はADM 2 / IMD添加時における被験物質の添加及び非添加のc - AMP產生量の差」から「PAMP及び／又はADM 2 / IMD非添加時における被験物質の添加及び非添加のc - AMP產生量の差」を引き、それを「被験物質添加時におけるPAMP及び／又はADM 2 / IMD添加及び非添加時のc - AMP產生量の差」で割って百分率とした、以下の[数3]の計算式を用いPAMP及び／又はADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用を評価してもよい。

【数3】

数3

$$\frac{\text{PAMP及び／又はADM}2/\text{IMD添加時に} \\ \text{おける被験物質の添加及び非添加のc} - \text{AMP产生量の差}}{\text{PAMP及び／又はADM}2/\text{IMD非添} \\ \text{加時における被験物質の添加及び非} \\ \text{添加のc - AMP产生量の差}} \times 100$$

被験物質添加時におけるPAMP及び／又はADM 2 / IMD添加及び非添加時の
c - AMP产生量の差

【0043】

上記(v)の工程の判定に用いる基準も特に限定されず、目的に応じて適宜設定することができる。例えば、上記[数3]の計算式で計算する場合、その値は10%以上が好ま

しく、20%以上がさらに好ましい。かかる値を示すメラニン産生抑制剤を含有する組成物は、優れた色素沈着予防又は改善効果を発揮する。従って、判定に用いる基準も上記範囲に基づいて設定されることが好ましい。

【0044】

本スクリーニング方法の評価に使用する細胞は、PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を有し、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系の不活性化作用を評価可能な細胞であれば特段限定されない。かかる細胞としては、メラノサイトが好適に例示出来る。また、スクリーニング系に使用可能な培養系としては、単独培養であっても共培養であってもよく、より好ましいものを具体的に挙げれば、メラノサイトの単独培養系、メラノサイト及びケラチノサイトの共培養系が好適なものとして例示出来る。また、PAMP及び／又はADM2／IMDシグナル伝達系を活性化する因子としては、PAMP、ADM2／IMD添加が好適に例示出来、両者を共に添加することも可能である。前記PAMP及び／又はADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の活性化は、被験物質添加前又は添加後の何れに行ってもよい。

【0045】

＜試験例1：PAMP、ADM2／IMD添加によるメラノサイトのメラニン産生量及び細胞数に関する検討＞

以下の手順に従い、PAMP、ADM2／IMD添加によるメラノサイトの産生量及び細胞数への影響を検討した。48穴プレートに正常ヒトメラノサイト(NHEM)(倉敷紡績株式会社)1.5×10⁴(cells/well)の密度で播種し、播種24時間後、合成PAMP(ペプチド研究所、4292-v)および、ADM2／IMD(ペプチド研究所、4421-s)を2(μM)になる様に添加し、さらに0.25(μCi/well)の[¹⁴C]-2-Thiouracilを添加した。CO₂インキュベーターにて72時間培養後、Cell Counting Kit-8(株式会社同仁研究所)を用い、細胞数を測定後、液体シンチレーションカウンター(アロカ株式会社)により[¹⁴C]-2-Thiouracilの取り込みを測定した。結果を図1及び図2に示す。図1及び図2において、縦軸は、メラニン産生量又は細胞数を表す。また、メラニン産生量又は細胞数は、PAMP、ADM2／IMD非添加群におけるメラニン産生量又は細胞数を100%とした場合の百分率で表示した。

【0046】

図1及び図2の結果より、PAMP、ADM2／IMD添加によってメラノサイトのメラニン産生量が増加することが確認された。この際、メラノサイト細胞数の増加は認められなかった。即ち、PAMP、ADM2／IMD結合受容体を介するシグナル伝達系が活性化されることにより、メラニン産生量が増加することが明らかである。

【0047】

＜試験例2：PAMP、ADM2／IMD添加によるメラノサイトのRAMP1、RAMP3、CRLR遺伝子発現量変化に関する検討＞

以下の手順に従い、PAMP、ADM2／IMD添加によるメラノサイトのRAMP1、RAMP3、CRLR遺伝子発現量への影響を検討した。48穴プレートに、正常ヒトメラノサイト(NHEM)(倉敷紡績株式会社)1.5×10⁴(cells/well)の密度で播種し、播種24時間後、合成PAMP(ペプチド研究所、4278-s)およびADM2／IMD(ペプチド研究所、4421-s)を2(μM)となる様に添加し、CO₂インキュベーターにて24時間培養し、Buffer RL T(QIAGEN社)により細胞を溶解し回収した。細胞回収後、RNeasy Mini Kit(QIAGEN社)を用いmRNAを抽出し、SuperScript VILO cDNA synthesis Kit(Invitrogen社)を用いcDNA(プライマー配列は、非公開)を合成し、QuantiTect Primer Assay(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR法によりmRNA発現量を測定した。各遺伝子のmRNA発現量は、TBP(内在性コントロール、プライマー配列は、配列表1に記載)のmRNA発現量を測定し、TBPのmRNA発現量との比率で算出した。結果を図3及び図4に示す。図3及び図4において、縦軸は、RAMP1、RAMP3、CRLRのmRNA発現量を表す。また、各発現量は、PAMP、ADM2／IMD非添加群における発現量を100%とした場合の百分率で表示した。

【0048】

図3及び図4の結果より、PAMP、ADM2／IMD添加によってメラノサイトにおけるRAMP1

、RAMP 3、CRLR のmRNA発現量の増加が認められた。即ち、PAMP、ADM 2 / IMD添加によって、PAMP、ADM 2 / IMD結合受容体を介するシグナル伝達系が活性化されることが明らかである。

【0049】

<試験例3：ケラチノサイト及びメラノサイト共培養系における紫外線照射によるメラニン産生量の検討>

以下の手順に従い、ケラチノサイト及びメラノサイト共培養系における紫外線照射によるメラニン産生量変化を調べた。更に、ケラチノサイト及びメラノサイト共培養系における紫外線照射により増加したメラニン産生量に対するADM 2 / IMD産生遺伝子発現を特異的に阻害するsi - RNA添加の影響を調べた。

1) 48穴プレートに、正常ヒトケラチノサイト（NHEK）（倉敷紡績株式会社）を、 $7 \cdot 0 \times 10^4$ (cells/well) の密度で、また、正常ヒトメラノサイト（NHEM）（倉敷紡績株式会社）を $2 \cdot 6 \times 10^4$ (cells/well) の密度でHumedia - KG 2 培地（倉敷紡績株式会社）を用いて播種し、24時間培養した（UV非照射群）。

2) si - RNA溶液を、Hs ADM 2 _ 7 FlexiTube siRNA (QIAGEN社) si - RNA溶液添加24時間、48時間後に東芝FL 2 0 S・E- 3 0 / DMRランプで 65mJ/cm^2 の紫外線（UV - B）を照射した（UV照射 + si - RNA添加群）。その後¹⁴C-thiouracilを $0 \cdot 25 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 添加した。

3) 比較対照群として、紫外線照射を行い、si - RNAを添加しない群（UV照射群）を設定した。

4) さらに48時間培養後Cell Counting Kit- 8（株式会社 同仁化学研究所）を用い、細胞数を測定後、液体シンチレーションカウンター（アロカ株式会社）により¹⁴Cの取り込みを測定した。メラニン量は、UV照射群から回収した細胞の放射線量を100%とした場合の、UV非照射群又はUV照射 + si - RNA添加群から回収した細胞の放射線量の百分率として算出した。即ち、各細胞内に取り込まれた放射線量が小さい程、メラニン量が小さいと判断することが出来る。結果を図5に示す。

【0050】

図5の結果より、ケラチノサイト及びメラノサイト共培養系におけるUV照射群のメラニン産生量は、UV非照射群に比較し、紫外線照射により増加したが、細胞数に大きな変化は認められなかった。更に、ケラチノサイト及びメラノサイト共培養系にsi - RNAを添加した後に、紫外線照射した場合には、si - RNAを添加せずに紫外線照射したUV照射群に比較し、メラニン産生量は減少した。このとき、細胞数には、大きな変化は認められなかった。即ち、ケラチノサイト及び/又はメラノサイト共培養系における紫外線照射によってメラニン産生量が増加すること、並びに紫外線照射により増加したメラニン産生量は、ADM2 / IMD産生遺伝子発現を特異的に抑制するsi - RNA添加によって、メラニン産生量が減少することが確認された。このことは、ケラチノサイトが産生するADM 2 / IMDによって、メラノサイトにおけるメラニン産生量が調節されることを示している。

【0051】

試験例1～3の結果より、メラノサイトにおけるPAMP、ADM 2 / IMDシグナル伝達系を活性化することによりメラニン産生量、ADM結合受容体遺伝子発現量が増加することが明らかになった。また、ケラチノサイト等により産生されるPAMP、ADM2 / IMD産生量の増減によりメラノサイトのADMシグナル伝達系の活性が調整され、メラニン産生量が増減することが明らかとなった。尚、PAMPは、ADM(Adrenomedullin)を前駆体とするため、その遺伝子発現は、ADM遺伝子発現量により評価することが出来る。また、ADM遺伝子発現量変化がメラニン産生に与える影響は、本願発明者が既に出願している特願2011-128652号に記載している。このため、メラノサイトにおけるPAMP、ADM 2 / IMDシグナル伝達系を不活性化させることにより、メラノサイトにおけるメラニン産生量を減少させることが出来ることが明らかである。PAMP、ADM 2 / IMDシグナル伝達系を不活性化させる作用を有する成分は、新規な作用機序に基づいたメラニン産生抑制剤といえる。

【0052】

<本発明の美白用組成物及び美白用組成物の設計方法>

上述した本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法によって、メラニン産生抑制効果に優れるメラニン産生抑制剤を選択することが明らかであるが、本スクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤を用い調製された美白用組成物、及び本スクリーニング方法を利用して美白用組成物を設計する方法も本発明である。本発明の美白用組成物及び美白用組成物の設計方法は、上述したスクリーニング方法によって選択されたメラニン産生抑制剤を用いるものであれば、その他の構成については特に限定されず、公知の調製方法を適宜用いることが出来る。

【0053】

本発明の美白用組成物及び美白用組成物の設計方法における、メラニン産生抑制剤の量は特段限定されないが、美白用組成物全量に対し、0.00001質量%～15質量%、より好ましくは、0.0001質量%～10質量%、さらに好ましくは、0.001質量～5質量%含有させることが好ましい。メラニン産生抑制剤の含有量が少なすぎると、目的とする色素沈着予防又は改善効果が低下する傾向にあり、多すぎても効果が頭打ちになる傾向があり、この系の自由度を損なう場合がある。また、美白用組成物に含有させるメラニン産生抑制剤の種類も1種類に限定されず、2種類以上を含有させてもよい。

【0054】

本発明の美白用組成物の製剤化にあたっては、通常の食品、医薬品、化粧料などの製剤化で使用される任意成分を含有することが出来る。この様な任意成分としては、経口投与組成物であれば、例えば、乳糖や白糖などの賦形剤、デンプン、セルロース、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルセルロースなどの結合剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウムなどの崩壊剤、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステルなどの界面活性剤、マルチトールやソルビトールなどの甘味剤、クエン酸などの酸味剤、リン酸塩などの緩衝剤、シェラックやツェインなどの皮膜形成剤、タルク、ロウ類などの滑沢剤、軽質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲルなどの流動促進剤、生理食塩水、ブドウ糖水溶液などの希釈剤、矯味矯臭剤、着色剤、殺菌剤、防腐剤、香料など好適に例示出来る。経皮投与組成物であれば、スクワラン、ワセリン、マイクロクリスタリンワックスなどの炭化水素類、ホホバ油、カルナウバワックス、オレイン酸オクチルドデシルなどのエステル類、オリーブ油、牛脂、椰子油などのトリグリセライド類、ステアリン酸、オレイン酸、レチノイン酸などの脂肪酸、オレイルアルコール、ステアリルアルコール、オクチルドデカノール等の高級アルコール、スルホコハク酸エステルやポリオキシエチレンアルキル硫酸ナトリウム等のアニオン界面活性剤類、アルキルベタイン塩等の両性界面活性剤類、ジアルキルアンモニウム塩等のカチオン界面活性剤類、ソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸モノグリセライド、これらのポリオキシエチレン付加物、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル等の非イオン界面活性剤類、ポリエチレングリコール、グリセリン、1,3-ブタンジオール等の多価アルコール類、増粘・ゲル化剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、色剤、防腐剤、粉体等を含有することができる。製造は、常法に従い、これらの成分を処理することにより、困難なく、為しうる。

【0055】

また、本発明のスクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤は、PAMP及び/又はADM2/IMDシグナル伝達系の不活性化作用によるメラニン産生抑制作用に加え、標的部位への集積性及び選択性に優れ、高い安全性及び安定性を有するために、医薬、化粧料等として利用が好ましい。その投与経路も、経口投与、経皮投与の何れもが可能であるが、皮膚における色素沈着予防又は改善作用を発揮するためには、皮膚への貯留性、標的部位への到達効率等を考慮し、経皮投与を採用することが好ましい。

【0056】

また、後述する実施例1又は実施例2に記載の本発明のメラニン産生抑制剤であるシソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物、オリーブより得られる植物抽出物は、丸善製薬株式会社より購入した植物抽出物を使用した。モクセイ科オリーブ属オリーブ

は、地中海周辺を原産地とする常緑中高木であり、四国などにおいて栽培されている。モクセイ科オリーブ属オリーブは、観賞用のほか、オリーブ油、ピクルスの原料植物として広く知られている。シソ科ハナハッカ属マジョラムは、エジプト、地中海沿岸を原産地とする多年草であり、香辛料、精油等に使用されている。また、前記の精油や植物抽出物には、沈静、抗不安作用等が存することが知られている。

【0057】

以下に、本発明について、実施例を挙げて更に詳しく説明を加えるが、本発明がかかる実施例のみに限定されることは言うまでもない。

【実施例1】

【0058】

<試験例4：本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法1>

以下の手順に従い、メラニン産生抑制剤のスクリーニング操作を行った。48穴プレートに正常ヒトメラノサイト（NHEM）（倉敷紡績株式会社） 1.5×10^4 (cells/well) の密度で播種し、播種24時間後、合成PAMP、ADM2/IMD（ペプチド研究所）を最終濃度2 μMになる様に添加し、さらに被験物質を培地中に最終濃度1%となる様に添加した。さらに0.25 (μCi/well) の [^{14}C] - 2 - Thiouracilを添加した。CO₂インキュベーターにて72時間培養後、Cell Counting Kit - 8（株式会社 同仁研究所）を用い、細胞数を測定後、液体シンチレーションカウンター（アロカ株式会社）により [^{14}C] - 2 - Thiouracilの取り込みを測定した。メラニンが合成された場合、Thiouracilが取り込まれ、放射活性が増加するため、放射活性の測定で合成されたメラニン量の比較が可能となる。尚、比較対照のために、PAMP又はADM2/IMD非添加群、被験物質非添加群でも同様な処理を行い、1) PAMP又はADM2/IMD (+) 被験物質 (-) 群、2) PAMP又はADM2/IMD (+) 被験物質 (+) 群、3) PAMP又はADM2/IMD (-) 被験物質 (+) 群、4) PAMP又はADM2/IMD (-) 被験物質 (-) 群のメラニン産生量を検出した。これらの各群のメラニン産生量データを用い、以下の【数4】の計算式を用いて、被験物質のメラニン産生抑制作用を算出した。

【数4】

数4

$$\frac{\left[\frac{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (+)} - \text{被験物質 (-)}}{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (+)} - \text{被験物質 (+)}} \right] - \left[\frac{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (-)} - \text{被験物質 (-)}}{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (-)} - \text{被験物質 (+)}} \right]}{\left[\frac{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (+)} - \text{被験物質 (-)}}{\text{PAMP 及び ADM2/IMD (-)} - \text{被験物質 (-)}} \right]} \times 100$$

【0059】

また、上記試験方法に従いモクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物を用いPAMP添加によるメラニン産生抑制作用評価を、シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出液を用いADM2/IMD添加によるメラニン産生抑制作用を評価した。その結果、メラニン産生抑制作用として、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物は30%、シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出液は28%の数値が算出された。かかる成分が、PAMP及び/又はADM2/IMD結合受容体を介するシグナル伝達系の不活性化作用に基づいて優れたメラニン産生抑制作用を發揮することが明らかである。

【実施例2】

【0060】

<試験例5：本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法2>

以下の手順に従い、メラニン産生抑制剤のスクリーニング操作を行った。尚、本スクリーニング法に使用した被験物質は、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物およびシソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物であり、丸善製薬株式会社より購入した市販の植物抽出物である。

48穴プレートに正常ヒトメラノサイト(NHEM)(倉敷紡績株式会社)1.5×10⁴(cells/well)の密度で播種し、播種24時間後、PAMP(ペプチド研究所、4278-s)およびADM2/IMD(ペプチド研究所、4421-s))を最終濃度2μMとなる様添加、被験物質を培地中に最終濃度1%となる様に添加しCO₂インキュベーターにて24時間培養し、Buffer RLT(QIAGEN社)により細胞を溶解し回収した。細胞回収後、RNeasy Mini Kit(QIAGEN社)を用いmRNAを抽出し、SuperScript VILO cDNA synthesis Kit(Invitrogen社)を用いcDNA(プライマー配列は、非公開)を合成し、QuantiTect Primer Assay(QIAGEN社)を用い、リアルタイムPCR法によりRAMP1 mRNA発現量を測定した。また、ADM結合受容体を介する作用を有さない美白剤のアルブチン10μg/mL(シグマ株式会社)について、同様の操作によりRAMP1 mRNA発現量を測定した。RAMP1 mRNA発現量は、TBP(内在性コントロール、プライマー配列は、配列表1に記載)のmRNA発現量を測定し、TBPのmRNA発現量との比率で算出した。結果を図6及び図7に示す。図6及び図7において、縦軸はRAMP1 mRNA発現量を表す。また、各々サンプルのRAMP1 mRNA発現量は、ADM及び被験物質非添加群のRAMP1 mRNA発現量を100%とした場合の百分率で表示した。

【0061】

図6の結果より、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物は、PAMP添加時に、RAMP1 mRNA発現量を抑制した。PAMP非添加時、添加時における、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物RAMP1 mRNA発現量抑制作用((PAMP添加時の植物抽出物非添加群のRAMP1 mRNA発現量 - PAMP添加時の植物抽出物添加群RAMP1 mRNA発現量) / (PAMP添加時の植物抽出物非添加群のRAMP1 mRNA発現量 - PAMP非添加時の植物抽出物非添加群RAMP1 mRNA発現量) * 100)は、92%の数値が算出された。

【0062】

図7の結果より、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物は、ADM2/IMD添加時に、RAMP1 mRNA発現量を抑制した。ADM2/IMD非添加時、添加時における、シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物RAMP1 mRNA発現量抑制作用((ADM2/IMD添加時の植物抽出物非添加群のRAMP1 mRNA発現量 - ADM2/IMD添加時の植物抽出物添加群RAMP1 mRNA発現量) / (ADM2/IMD添加時の植物抽出物非添加群のRAMP1 mRNA発現量 - ADM2/IMD非添加時の植物抽出物非添加群RAMP1 mRNA発現量) * 100)は、50%の数値が算出された。

【0063】

一方、図8の結果より、美白剤であるアルブチンは、PAMP、ADM2/IMD非添加及び添加時のRAMP1 mRNA発現量にほとんど影響を及ぼさなかった。モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物、シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物、およびアルブチンは、共に本試験に用いた濃度においてメラニン産生抑制作用を示すが、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物は、PAMP添加時の方がより高いメラニン産生抑制作用を示すことが確認されている。そしてシソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物はADM2/IMD添加時の方がより高いメラニン産生抑制作用を示すことが確認されている。また、PAMP、ADM2/IMD結合受容体を介するシグナル伝達系を活性化することによりメラニン産生量が増加し、PAMP、ADM2/IMD結合受容体を介するシグナル伝達系が関与するメラニン産生系の存在が示されている。このため、上記結果から、本スクリーニング方法が、PAMP、ADM2/IMD結合受容体を介するシグナル伝達系を阻害することによりメラニン産生抑制作用を発揮する成分を選択的、精度よくスクリーニング出来る方法であるといえる。

【実施例3】

【0064】

<製造例1：本発明の美白用組成物の製造方法1>

以下の手順に従い、本発明のメラニン産生抑制剤のスクリーニング方法により選択されたメラニン産生抑制剤を含有する美白用組成物(皮膚外用剤)を作製した。即ち、表1及び表2の処方成分(A)に記載の各成分を合わせ、室温下に溶解した。一方、処方成分(B)に記載された各成分を室温下に溶解し、これを前記(A)に記載された成分の混合物を

加え可溶化し、本発明の美白用組成物（皮膚外用剤1及び2）を得た。また、本発明のメラニン產生抑制剤を水に置換した比較例1を作製した。

【0065】

【表1】

成分	質量%
(A)	
精製水	78.9
グリセリン	5.0
プロピレンジエーテル	4.0
(B)	
POE(20)ソルビタンモノアクリル酸エステル	1.5
POE(20)ラクリルエーテル	0.5
エタノール	10.0
「本発明のメラニン產生抑制剤」	0.1
計	100

【0066】

【表2】

本発明の美白用組成物	本発明のメラニン產生抑制剤
皮膚外用剤1	シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物
皮膚外用剤2	モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物

【実施例4】

【0067】

実施例3に記載の方法に従い製造された本発明の美白用組成物（皮膚外用剤1及び2）及び比較例1に関し、以下の手順に従い色素沈着抑制作用を評価した。自由意思で参加したパネラーの上腕内側部に1.5cm×1.5cmの部位を合計4ヶ所設けた。最少紅斑量（1MED）の紫外線照射を設けた部位に1日1回、3日連続して3回照射した。試験1日目の紫外線照射終了時（一回目照射終了後）より、1日2回35日連続してローション50μLを塗布した。3部位のうち1部位は無処置部位とした。35回の塗布終了24時間後に色彩色差計（CR-300、コニカミノルタ株式会社）にて各試験部位の皮膚明度（L*値）を測定し、処理部位のL*と無処理部位L*の差（L* = 処理部位のL* - 無処理部位L*）を算出した。L*値は、色素沈着の程度が強いほど低い値となる。従って、L*値が大きいほど、色素沈着が改善されたと判断することが出来る。結果を表3に示す。これにより、本発明の皮膚外用剤1及び2は優れた色素沈着抑制効果を有することが分かる。これは、皮膚外用剤1及び2に含有されるメラニン產生抑制剤（シソ科ハナハッカ属マジョラムより得られる植物抽出物、モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物）のPAMP及び/又はADM2/IMDシグナル伝達系を抑制することによるメラニン產生抑制作用によると考えられる。

【0068】

【表3】

表3

検体	△L*値
皮膚外用剤1	0.89
皮膚外用剤2	0.92
比較物1	0.12

【実施例 5】

【0069】

< 製造例 2 : 本発明のメラニン產生抑制剤を含有する健康食品の製造 >

表 4 及び表 5 に示す処方に従い、健康食品 1 を作製した。即ち、処方成分を 10 重量部の水と共に転動相造粒（不二パウダル株式会社製「ニューマルメライザー」）し、打錠して錠剤状の健康食品を得た。尚、表中の数値の単位は、重量部を表す。本健康食品は、優れた色素沈着予防又は改善効果を示していた。

【0070】

【表 4】

表4

成分	重量部
乳糖	20.0
結晶セルロース	41.2
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	8.0
ステアリン酸マグネシウム	0.5
「本発明のメラニン產生抑制剤」	0.3

【0071】

【表 5】

表5

本発明の美白用組成物	本発明のメラニン產生抑制剤
皮膚外用剤	シノ科ヘナツカ属マジョラムより得られる植物抽出物
皮膚外用剤	モクセイ科オリーブ属オリーブより得られる植物抽出物

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明は、食品、医薬品、化粧料等に応用出来る。