

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7110825号

(P7110825)

(45)発行日 令和4年8月2日(2022.8.2)

(24)登録日 令和4年7月25日(2022.7.25)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

Z

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15

Z

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 33/53

Q

請求項の数 3 (全7頁)

(21)出願番号 特願2018-156842(P2018-156842)

(22)出願日 平成30年8月24日(2018.8.24)

(65)公開番号 特開2019-45493(P2019-45493A)

(43)公開日 平成31年3月22日(2019.3.22)

審査請求日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(31)優先権主張番号 特願2017-165880(P2017-165880)

(32)優先日 平成29年8月30日(2017.8.30)

(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者 000002819

大正製薬株式会社

東京都豊島区高田3丁目24番1号

(72)発明者 松岡 柚衣美

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大

正製薬株式会社内

(72)発明者 長濱 徹

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大

正製薬株式会社内

(72)発明者 吉村 知久

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大

正製薬株式会社内

(72)発明者 板垣 宏

神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79番

1号

国立大学法人横浜国立大学

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物エキスの皮膚感作性インビトロ評価法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞に感作性物質を含有すると予想される被験物質を添加して曝露し、該細胞の表面に発現された分子を検出する感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法において、前記感作性物質を含有すると予想される被験物質が植物エキスであり、前記添加する植物エキスの濃度が $5000\mu\text{g}/\text{ml} \sim 500000\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、かつ、曝露時間が $1 \sim 30$ 分であることを特徴とする、植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法。

【請求項2】

細胞表面に発現される分子がCD86である、請求項1に記載の植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法。

10

【請求項3】

細胞がヒト単核球細胞THP-1細胞である、請求項1に記載の植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物エキスの皮膚感作性インビトロ評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

20

皮膚感作性は化学物質の安全性評価において重要な評価項目であり、従来、モルモットやマウスを用いた動物実験によって評価されてきた。2013年3月にEUにおいて、動物実験により安全性が評価された成分を含む化粧品の販売が禁止されたことを受け、in silicoやin vitro代替法の動物を用いない試験法の開発が強く望まれている。

human Cell Line Activation Test (h-CLAT) は、多くの皮膚感作性物質が樹状細胞を活性化することに着目した試験法であり、2016年7月にOECDのガイドライン化がなされた (OECD TG422E)。ヒト単核球細胞であるTHP-1細胞を用いて、細胞表面上のCD86とCD54を測定することにより皮膚感作性の有無を判定する試験法である (非特許文献1)。

一方で、h-CLATには試験に適用できない物質がある。例えば、化粧品原料の中には植物エキスをはじめとする天然由来の混合物が多く存在し、これら混合物の成分には感作性物質が含まれる可能性がある。しかしながら植物エキス中の感作性物質は非常に微量であるため、OECDのガイドラインに収載されたh-CLATでは検出できない事例が多い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【文献】特開2001-221796号公報

【非特許文献】

【0004】

【文献】JaCVAM 皮膚感作性試験試料編纂委員会 (2016) 皮膚感作性試験報告書 human Cell Line Activation Test (h-CLAT)

OECD 442E (2016) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

従って、本発明はこれまで検出できなかった植物エキスの皮膚感作性を評価することができる方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記の目的を達成するため、鋭意検討した結果、植物エキスの皮膚感作性を評価する場合、細胞と植物エキスを曝露する際の曝露時間を短時間にし、植物エキスを高濃度で曝露し、該細胞表面に発現される、感作性物質の量や特性を反映する分子を測定することにより、これまで困難であった植物エキスの動物を用いない皮膚感作性を評価することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、

(1) 細胞に感作性物質を含有すると予想される被験物質を添加して曝露し、該細胞の表面に発現された分子を検出する感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法において、前記感作性物質を含有すると予想される被験物質が植物エキスであり、前記添加する植物エキスの濃度が $5000 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 500000 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、かつ、曝露時間が1～30分であることを特徴とする、植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法、

(2) 細胞表面に発現される分子がCD86である、(1)に記載の植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法、

(3) 細胞がヒト単核球細胞THP-1細胞である、(1)に記載の植物エキス中の感作性物質のインビトロ評価方法又はスクリーニング方法、である。

【発明の効果】

【0008】

本発明の植物エキスの皮膚感作性インビトロ評価法は、化粧品原料に含まれる植物エキ

10

20

30

40

50

スの皮膚感作性の予測ができる効果が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】試験例 2 における、OECD TG422E の手順通りに皮膚感作性を評価したときの CD86 の発現量と細胞毒性（細胞生存率）を示したグラフである。

【図 2】実施例 1 における、短時間曝露法を用いて皮膚感作性を評価したときの CD86 の発現量と細胞毒性（細胞生存率）を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

本発明において用いる細胞としては、感作性物質の特性を反映してその表面に CD86 物質を発現するものであれば特に限定されないが、具体例としてヒト単核球細胞である THP-1 が挙げられる。この細胞は樹立した培養細胞であって、当業界の研究者により広く用いられており、容易に入手することができる。具体的には THP-1 細胞は、公的な細胞バンク又は民間企業より入手することができる。

10

【 0 0 1 1 】

本発明の細胞を培養するための培地としては、これらの細胞を培養することができる常用の任意の培地を使用することができるが、例えば具体例として RPMI 1640 Medium が挙げられる。これらの培地にはおよそ 10% 程度のウシ胎児血清を添加することが必要である。

【 0 0 1 2 】

20

本発明に関する植物エキ스는各種溶媒、例えば水、エタノール、多価アルコール等により抽出されたものが好ましい。

【 0 0 1 3 】

本発明の植物エキスのインビトロ評価又はスクリーニングにおいては、上記細胞に植物エキスを加え、例えば室温にて 5 分間曝露を行い、その後 CO₂ インキュベーター中で、約 37 にて後培養を行う。曝露時間は、好ましくは 1 ~ 30 分、より好ましくは 1 ~ 10 分、さらに好ましくは 1 ~ 5 分である。従来の OECD TG422E（非特許文献 2）の試験法では、曝露時間は 24 時間必要なため、本発明により短時間で評価できる。

【 0 0 1 4 】

上記細胞の初期濃度は $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / mL が好ましい。植物エキスの評価を行う場合は、細胞に、植物エキスを加えて、上記の条件で培養を行う。この際の植物エキスの濃度は $5000 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 500000 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、より好ましくは $50000 \mu\text{g} / \text{mL} \sim 250000 \mu\text{g} / \text{mL}$ が好ましい。対照とする場合も、好ましくは、生理食塩水を同量加えて上記と同様の培養を行い、対照とする。

30

【 0 0 1 5 】

後培養まで終了した後、培養した細胞の表面に発現された CD86 分子を検出又は測定する。CD86 の検出または測定方法は特に限定されないが、抗 - ヒト CD86 抗体を用いた免疫測定が好ましく、フローサイトメトリー法が特に好ましい。抗 - ヒト CD86 抗体はモノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、CD86 を表面に発現している細胞を免疫原として用いて常法に従って調製することができる。フローサイトメトリー法も常法に従って行うことができる。

40

【実施例】

【 0 0 1 6 】

以下に実施例および試験例を挙げ、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されない。

【 0 0 1 7 】

（試験例 1）従来の動物での皮膚感作性試験による評価

Adjuvant を用いた試験は、白色モルモットを試験動物とし、1 群 5 匹以上の例数を確保した。投与経路は皮内及び経皮とし、第 1 回目の感作処置では除毛した頸背部皮膚にフロイント・コンプリート・アジュバント（FCA）、各種植物エキス（いずれも

50

原液)、FCAと植物エキスの乳化物の皮内注射を行った。第2回目の感作処置では第1回感作処置の1週間後、同部位に48時間閉塞貼付を施した。さらに、惹起処置として第2回感作処置の2週間後、除毛した背部又は側腹部に24時間閉塞貼付を行った。皮膚感作性の判定は、貼付除去後24時間及び48時間目に投与部位を肉眼にて観察した。Adjuvantを用いない試験法は、白色モルモットを試験動物とし、1群5匹以上の例数を確保した。投与経路は経皮とし、感作処置は1回/週、合計3回行い、除毛した背部皮膚に植物エキスを6時間閉塞貼付した。惹起処置として、3回目の貼付終了2週間後、側腹部に6時間の閉塞貼付を施した。皮膚感作性の判定は、貼付除去後24時間及び48時間目に投与部位を肉眼にて観察した。

なお、植物エキスは緑茶エキス(市販品の緑茶リキッド)、セージエキス(市販品のファルコレックスセージE)、ボタンピエキス(市販品のファルコレックス ボタンピE)を使用した。

結果を以下表1に示す。

【0018】

【表1】

	緑茶エキス	セージエキス	ボタンピエキス
動物試験(+Adjuvant)	陽性	陽性	陰性
動物試験(-Adjuvant)	陰性	陰性	

【0019】

(試験例2) OECD TG422E(非特許文献2)の試験法による評価

試験例1と同じ植物エキスを使用して評価を行った

THP-1細胞(ATCCより購入)をRPMI1640(含10%FBS)培地を用いて 2×10^6 細胞/mLに調製し、24wellプレートに500 μ L/wellずつ播種した。被験物質である植物エキスはTG422Eに基づきCV75決定試験を行った。いずれも最高濃度の5000 μ g/mLでも細胞毒性を示さなかったため、5000 μ g/mLから公比1.2で7濃度振り、細胞を播種したプレートにそれぞれ500 μ Lずつ加えた。

処理した細胞はCO₂インキュベーター中で24時間曝露した。曝露後の細胞をFACS buffer(0.1%w/v BSA)を用いて洗浄し、Blocking buffer(含1%w/v globulin)でブロッキング後、FITCで蛍光標識した抗ヒトCD86抗体を用いて氷上で30分間染色した。染色した細胞をFACS bufferを用いて2度洗浄し、FACS buffer 200 μ Lに再懸濁した。この細胞懸濁液を用いてフローサイトメトリーにより生細胞 1×10^4 cellsの蛍光強度を測定し、生理食塩水を作用させたコントロールと比較した。生細胞の検出はPI染色により行った。

【0020】

<試験結果>

結果を図1に示す。OECD TG422Eの試験法どおりに試験を行った結果、植物エキス3種すべてで皮膚感作性が認められなかった(RFIの値がCD86 150を満たさない)。このことから、この試験法では植物エキスの皮膚感作性を予測するには感度が不足しているということが明らかとなった。

【0021】

(実施例1) 本発明の短時間曝露法(STE法(短時間、高濃度で曝露する試験法))による評価

試験例1と同じ植物エキスを用いて評価を行った。

THP-1細胞(ATCCより購入)をRPMI1640(含10%FBS)培地を用いて 1×10^6 細胞/mLに調製し、1.5mLチューブに1mLずつ分注後、遠心し培地を除去した。被験物質である植物エキスはCV75決定試験を行い、緑茶:122785 μ g/mL、セージ:52761 μ g/mL、ボタンピ:257305 μ g/mLとなった。それぞれのCV75に従い、生理食塩水を用いて濃度を適宜決定し、500 μ Lずつ培地を除去した細胞に5分間曝露した。曝露後、PBSで

2度洗浄し、培地を1mL加え、24wellプレートに播種し、後培養を24時間行った。

後培養後の細胞をFACS buffer (0.1%w/v BSA) を用いて洗浄し、Blocking buffer (含1%w/v globulin) でブロッキング後、FITCで蛍光標識した抗ヒトCD86抗体を用いて氷上で30分間染色した。染色した細胞をFACS bufferを用いて2度洗浄し、FACS buffer 200 μ Lに再懸濁した。この細胞懸濁液を用いてフローサイトメトリーにより生細胞 1×10^4 cellsの蛍光強度を測定し、生理食塩水を作用させたコントロールと比較した。生細胞の検出はPI染色により行った。

【0022】

<試験結果>

結果を図2に示す。短時間曝露法で試験を行った結果、動物(+Adjuvant)で陽性となっているエキス2種(緑茶エキス、セージエキス)については皮膚感作性が認められた(RFIの値がCD86 150を満たしている)。しかし、動物(+Adjuvant)で陰性と判定がなされているボタンピエキスでは、皮膚感作性が認められなかった。

10

このことから、本発明の評価法を用いた試験では、植物エキスの皮膚感作性を予測し得ることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0023】

本発明の評価方法により、これまで検出できなかった植物エキスの皮膚感作性を評価することが可能となるので、化粧品、香料などの香粧品分野において、動物を用いずに植物エキスの感作性の有無及び強弱の評価が可能となる。

20

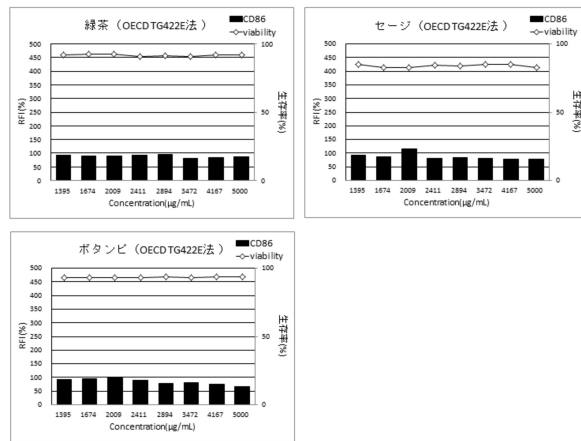
30

40

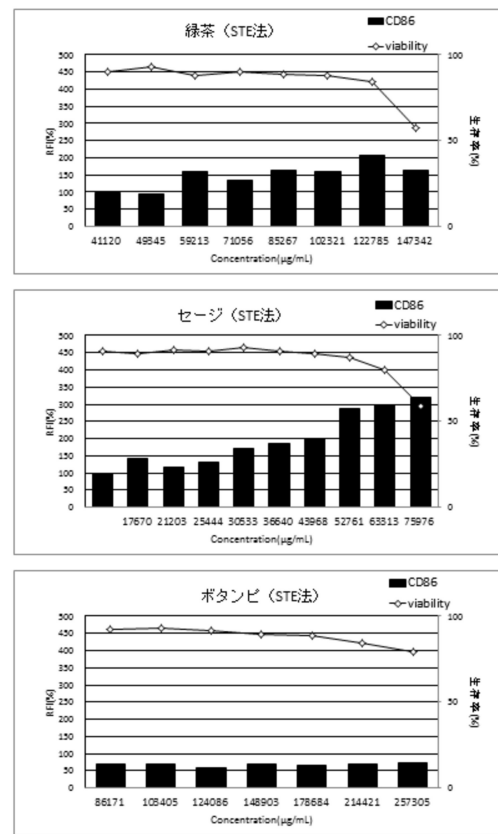
50

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

審査官 白形 優依

- (56)参考文献 特表 2 0 1 0 - 5 0 4 7 4 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 4 2 2 1 (W O , A 1)
特開 2 0 0 1 - 2 2 1 7 9 6 (J P , A)
特開 2 0 0 4 - 2 2 2 5 8 2 (J P , A)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 1 3 4 6 6 (U S , A 1)
特開平 1 0 - 2 3 2 2 2 5 (J P , A)
MIZOGUCHI, I. et al. , Prediction of Chemical Respiratory and Contact Sensitizers by OX40L Expression in Dendritic Cells Using a Novel 3D Coculture System , Frontiers in Immunology , 2017年08月 , Vol.8, Article 929 , pp.1-12
SHIRAIISHI, E. et al. , Utility of murine dendritic cell line DC2.4 for in vitro assay of skin-sensitization potential , Fundamental Toxicological Sciences , 2017年06月09日 , Vol.4, No.3 , pp.121-126
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 1 5
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
医中誌 W E B