

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02012/042970

発行日 平成26年2月6日(2014.2.6)

(43) 国際公開日 **平成24年4月5日(2012.4.5)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/28 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	T 4 C 0 8 3
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	4 C 0 8 8
A 6 1 K 8/97 (2006.01)	A 6 1 K 8/97	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
A 6 1 Q 19/10 (2006.01)	A 6 1 Q 19/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号	特願2012-536248 (P2012-536248)	(71) 出願人	504174180 国立大学法人高知大学 高知県高知市曙町二丁目5番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2011/061910	(74) 代理人	100075409 弁理士 植木 久一
(22) 国際出願日	平成23年5月24日(2011.5.24)	(74) 代理人	100129757 弁理士 植木 久彦
(31) 優先権主張番号	特願2010-217400 (P2010-217400)	(74) 代理人	100115082 弁理士 菅河 忠志
(32) 優先日	平成22年9月28日(2010.9.28)	(74) 代理人	100125243 弁理士 伊藤 浩彰
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100125173 弁理士 竹岡 明美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤、および外用剤

(57) 【要約】

ステロイド剤と同等またはそれ以上の抗掻痒作用および抗炎症作用を有しており、アトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤として有用な技術を提供する。本発明に係るアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤は、*Vernonia Amygdalina* 葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有している。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Vernonia Amygdalina 葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有することを特徴とするアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤。

【請求項 2】

Vernonia Amygdalina 葉、および/またはそのアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有することを特徴とする外用剤。

【請求項 3】

化粧品として用いられるものである請求項 2 に記載の外用剤。

【請求項 4】

入浴剤として用いられるものである請求項 3 に記載の外用剤。

【請求項 5】

Vernonia Amygdalina 葉、および/またはそのアルコールおよび/または水の抽出物を含有することを特徴とする化粧品用素材。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Vernonia Amygdalina* (VAM) 葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有するアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤；VAM 葉および/またはその上記抽出物を有効成分として含有する化粧品などの外用剤；並びに、VAM 葉および/またはその上記抽出物を含有する外用剤素材に関するものである。

【背景技術】

【0002】

アトピー性皮膚炎は強い痒みを伴う皮膚疾患であり、そのためアトピー性皮膚炎の患者は引っ掻き行動を頻繁に行なって炎症部位の慢性化を招いている。アトピー性皮膚炎では血清中の IgE 濃度が上昇するほか、炎症の初期には好中球、中期にはマクロファージ、後期には好酸球の増加が見られるなど、炎症細胞の特徴的な推移が見られる。現在、アトピー性皮膚炎の治療剤として、副腎皮質ホルモンを主体とするステロイド剤が汎用されているが、抗かゆみ作用（抗掻痒作用）は不十分であるという問題を抱えている。

【0003】

一方、*Vernonia Amygdalina* (ベルノニア アミグダリナ) は、熱帯アフリカに広く自生するキク科灌木であり、この水溶性葉抽出物はヒト乳癌に対して抗癌活性を有することが知られている。また、特許文献 1 および 2 には、*Vernonia Amygdalina* 乾燥葉をクロロホルム抽出、*n*-ヘキサン-メタノール抽出、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC 等により精製して得られた水不溶性のベルノダリンまたはそのジヒドロ体が、マウス白血病細胞に対する抗腫瘍効果や、マウス T 細胞依存性/非依存性の抗体産生能を有することが報告されている。また特許文献 3 には、極性溶媒またはその混合物により抽出された *Vernonia Amygdalina* の抽出物が体毛喪失予防および/または体毛成長促進の作用を有することが報告されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開平 6 - 16550 号公報

【特許文献 2】特開平 6 - 192265 号公報

【特許文献 3】特開 2009 - 532342 号公報

【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、上記特許文献を含め、これまでに *Vernonia Amygdali*

10

20

30

40

50

n a葉のアルコールおよび/または水の抽出物とアトピー性皮膚炎との関係について具体的に開示されたものはない。

【0006】

また、Vernonia Amygdalina葉やその上記抽出物を化粧品や入浴剤に用いたものものこれまで開示されていない。

【0007】

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであって、その目的は、ステロイド剤と同等またはそれ以上の抗掻痒作用および抗炎症作用を有しており、アトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤として極めて有用な技術を提供することにある。

【0008】

更に本発明の他の目的は、例えば、抗掻痒作用や抗炎症作用などを発揮し得る新規な外用剤およびその原料となる外用剤素材を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決し得た本発明に係るアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤は、Vernonia Amygdalina葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有するところに要旨を有するものである。

【0010】

また、上記課題を解決し得た本発明の外用剤は、Vernonia Amygdalina葉、および/またはそのアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有するところに要旨を有するものである。

【0011】

本発明の好ましい実施形態において、上記外用剤は、化粧品として用いられるものである。

【0012】

本発明の好ましい実施形態において、上記化粧品は、入浴剤として用いられるものである。

【0013】

本発明には、Vernonia Amygdalina葉、および/またはそのアルコールおよび/または水の抽出物を含有する化粧品用または入浴剤用素材も包含される。

【発明の効果】

【0014】

本発明の予防剤または治療剤は、Vernonia Amygdalina葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有するため、汎用のステロイド剤と同等またはそれ以上に高い抗掻痒作用および抗炎症作用が発揮される。

【0015】

また、Vernonia Amygdalina葉自体、および/またはその上記抽出物は、外用剤素材として有用であり、これらを含む外用剤は、例えばローション、乳液、石鹸、入浴剤などの化粧品として好適に用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、実施例1における引っ掻き回数の経時的变化を示すグラフである。

【図2】図2は、実施例1における耳介腫脹の経時的变化を示すグラフである。

【図3】図3は、実施例1における臨床症状の経時的变化を示すグラフである。

【図4】図4は、実施例1におけるマウス耳および炎症細胞の結果を示す写真である。

【図5】図5は、実施例1における血清中IgE抗体の結果を示すグラフである。

【図6】図6は、実施例2における耳介腫脹の経時的变化を示すグラフである。

【図7】図7は、実施例2における耳介腫脹（重量）の結果を示すグラフである。

【図8】図8は、実施例2における臨床症状の結果を示すグラフである。

【図9】図9は、実施例2におけるマウス耳および炎症細胞の結果を示す写真である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明者らは、*Vernonia Amygdalina* (ベルノニア アミグダリナ) 葉のアルコールおよび/または水の抽出物について種々検討をしてきた。その結果、上記抽出物はアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤のいずれにおいても適用可能であり、驚くべきことに、汎用のステロイド剤と同等またはそれ以上に優れた抗掻痒作用および抗炎症作用を両方有することを見出し、本発明を完成した。上述したようにステロイド剤は、抗掻痒作用が弱く、激しい痒みのために炎症部位が慢性化するという問題があるのに対し、本発明の抽出物は抗掻痒作用にも優れているため、このような問題を解消することができる。

10

【0018】

また、*Vernonia Amygdalina* 葉自体、および/またはその上記抽出物は、外用剤素材として有用であり、これらを含む外用剤は、例えば化粧水、乳液、石鹸、入浴剤などの化粧料として好適に用いられる。例えば入浴剤などは、*Vernonia Amygdalina* の抽出物のみならず *Vernonia Amygdalina* 葉もそのまま、湯中に浸漬するなどして使用することができる。上記外用剤の使用により、例えば、抗掻痒作用や抗炎症作用などの効能が期待される。

【0019】

以下、本発明について詳細に説明する。本明細書では、*Vernonia Amygdalina* を VAM と略記する場合がある。また、*Vernonia Amygdalina* 葉のアルコールおよび/または水の抽出物を、単に VAM 葉の抽出物と呼ぶ場合がある。

20

【0020】

(1) アトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤

まず、本発明に係るアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤について説明する。上記予防剤または治療剤は、VAM 葉のアルコールおよび/または水の抽出物を有効成分として含有する。

【0021】

本発明に用いられる抽出物は、VAM 葉を用い、アルコールおよび/または水の溶媒で抽出した後の抽出液(ろ過後の溶出部分)である。ただし、これに限定されず、保存安定性などを考慮して、必要に応じて、その後上記抽出液を濃縮したり上記溶媒に再溶解したり、あるいは乾燥したりするなど通常用いられる精製手段を行っても良く、このような処理を行なったものも、本発明に用いられる抽出物の範囲に包含される。

30

【0022】

以下、上記抽出物を得るための好ましい抽出方法を説明する。

【0023】

まず、原料として *Vernonia Amygdalina* (VAM) の葉を用意する。本発明に用いられる VAM の産地や採取時期などは特に限定されないが、アトピー性皮膚炎に対する優れた予防作用または治療作用を得るためには、VAM の新葉などが好ましく用いられる。

40

【0024】

本発明では、VAM のうち葉を抽出材料として用いる。葉のなかにアトピー性皮膚炎の予防または治療に有用な成分が含まれていると考えられるからである。本発明では、葉のみを用いても良いが、本発明の作用を損なわない範囲で、葉以外の部分(茎や根など)が含まれていても良い。

【0025】

以下の抽出を行なう前に、必要に応じて、VAM の葉を洗浄したり乾燥しても良い。乾燥の条件は特に限定されないが、有効成分の細胞内水分による変性や腐敗を考慮すると、収穫後、風通しを良くするために竿に吊るして天日で乾燥を行なうことが好ましい。

【0026】

50

また、抽出効率を高めるため、抽出の前にVAMの葉を粉砕することが好ましい。粉砕方法は特に限定されず、例えば、ボールミル、ハンマーミル、ローラーミル、ロッドミル、サンプルミル、スタンプミル、エヒスイテグレーター、冷却装置付きブレンダーなどを用い、おおむね1mm～10mmのサイズに粉砕することが好ましい。

【0027】

次に、粉砕した材料にアルコールおよび/または水の溶媒を加えて浸漬させ、有効成分を抽出する。本発明では、抽出溶媒として、メタノール、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等のアルコール：または水を単独で用いても良いし、これらの混合溶媒を用いても良い。上記混合溶媒としては、例えばメタノールと水、エタノールと水などが挙げられ、具体的には、例えばメタノール：水＝50：50～80：20のものが例示される。後記する実施例に示すように、水よりもアルコール（特にメタノール）抽出物の方が、高い活性が得られる。

10

【0028】

上記の浸漬条件は、抽出溶媒の種類や抽出材料の量などに応じ、適宜調節することができる。例えば用いられる抽出溶媒の量は、抽出材料であるVAM葉が、少なくとも万遍なく浸漬する程度とし、有効成分の抽出量や濃縮する際の効率などを考慮して適宜調節すればよいが、おおむね、乾燥状態の抽出材料100質量部に対し、抽出溶媒を約100～1000の割合で用いることが好ましい。

【0029】

抽出温度も特に制限されず、抽出効率を高めるために30～50程度に加温してもよいが、有効成分が分解される恐れがあるので、室温で抽出することが好ましい。抽出時間も適宜調節すればよいが、おおむね、室温で5～10日間程度であることが好ましい。

20

【0030】

抽出効率を更に高めるために、抽出材料に抽出溶媒を加えた後、攪拌することが好ましい。あるいは、抽出材料に抽出溶媒を加えた後、上記の粉砕機などを用いて磨り潰すことも好ましい態様である。

【0031】

本発明では、上記の抽出処理を行なった後、濾過等によって抽出残渣を除去し、得られた抽出液を、そのままアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤として用いることができる。

30

【0032】

あるいは本発明では、上記のようにして得られた抽出液を濃縮したものや、さらに前述したアルコールおよび/または水の抽出溶媒に再溶解したものを、アトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤として用いることもできる。これにより、保存安全性などが向上する。濃縮処理では、濃縮温度の抑制や作業効率の観点からエバポレーターを用いて蒸留することが好ましい。具体的な蒸留条件は、有効成分の抽出量や濃縮する際の効率などを考慮して適宜調節すればよいが、おおむね、温度：約20～55、圧力：約400～600hPaにて蒸留を行なうことが好ましい。

【0033】

本発明では、上記のように濃縮や再溶解を行なったものを、そのままアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤として用いても良いが、一旦乾燥し、使用直前に抽出溶媒に適宜溶かして用いることもできる。

40

【0034】

本発明に係るアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤は、上記のようにして得られた抽出物を有効成分として含むものである。上記の抽出物には、医薬的に通常用いられる公知の製剤成分を添加し、様々な製剤とすることができる。例えば、基材、賦形剤、着色剤、滑沢剤、矯味剤、乳化剤、増粘剤、湿潤剤、安定剤、保存剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、抗酸化剤、佐薬、緩衝剤、pH調整剤、甘味料、香料などを添加することができる。また、これら添加剤の配合量は、本発明の作用効果を妨げない様な量である限り、必要に応じて適宜設定することができる。

50

【0035】

上記予防剤又は治療剤の適用方法は特に限定されず、外用剤（軟膏剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤、パップ剤など）、粘膜適用剤（トローチ剤、坐剤など）、注射剤、経口投与剤（散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エキス剤、流エキス剤、エリキシル剤、懸濁剤・乳剤、チンキ剤、シロップ剤など）などの形態で適用することができる。

【0036】

例えば上記VAM葉抽出物を用いる場合、いったん濃縮して粉末とした抽出物を、水等の溶媒に再溶解または再分散する。このときの抽出物の濃度は特に制限されず、被験者の状態等により適宜調節すればよいが、例えば、乾燥状態の抽出物の濃度に換算して、約50～200g/L程度とすることが好ましい。

10

【0037】

上記抽出物の溶媒としては、ヒトや動物が飲用するに適した水が好ましい。例えば、蒸留水、精製水、純水、水道水などを用いればよい。また、微量のエタノールなどを添加してもよい。

【0038】

本発明に係るアトピー性皮膚炎の予防剤または治療剤の投与量は、投与すべき被験者の症状や年齢や性別；抽出物の構成などに応じ、所望の作用効果が得られるように適宜適切に調製すれば良い。例えばラットには、おおむね、200mg/kg/日程度投与することが好ましいが、ヒトに対しては、より少ない量であることが好ましい。何れにせよ、被験者の状態等を充分考慮し、投与量は適宜調節すればよい。

20

【0039】

(2) 外用剤

上記VAM葉および/またはその抽出物（アルコールおよび/または水の抽出物）は、外用剤の原料として用いることができる。外用剤は、更に皮膚外用剤と化粧品に大別される。上記皮膚外用剤としては、例えば軟膏剤、貼付剤、リニメント剤、ローション剤、パップ剤などが挙げられる。

【0040】

上記化粧料の種類は特に限定されず、例えば乳液、化粧水（ローション）、クリーム、洗顔料、ジェル、エッセンス（美容液）、パック・マスク、ひげそり用化粧料などの基礎化粧品；ファンデーション類、口紅類。白粉・打粉類、頬紅類、眉目類、美爪類などのメーキャップ化粧品；洗髪用化粧品（シャンプーやリンスなど）、育毛剤、毛髪仕上げ用化粧品（ヘアスタイリング剤、ヘアトリートメント剤など）；パーマントウェーブ用剤、染毛剤、ヘアブリーチなどの毛髪化粧品；香水やコロンなどの芳香化粧品；石鹸、液体ボディ洗剤、サンケア製品、ハンドケア製品、防臭化粧品、脱色剤・除毛剤、入浴剤（浴用剤）などのボディ化粧品；歯磨類、口中清涼剤などの口腔用化粧品などが挙げられる。

30

【0041】

上記化粧料として用いる場合、VAM葉抽出物などの有効成分のほかに、化粧料原料として通常用いられる成分を適宜配合することができる。上記成分としては、例えば、油脂、ロウ類、炭化水素、高級脂肪酸、高級アルコール、エステル類、シリコン油などの油性原料；アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤などの界面活性剤；グリセリン、プロピレングリコールなどの保湿剤；増粘剤高分子（キサンタンガム、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど）、皮膜剤高分子（ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなど）などの高分子化合物；紫外線吸収剤；酸化防止剤；金属イオン封鎖剤などが挙げられる。

40

【0042】

以下、本発明に用いられるが外用剤の代表例として、入浴剤および化粧料を代表的に取り上げて、より詳細に説明する。

【0043】

(入浴剤)

50

入浴剤として用いる場合、前述したVAM葉の抽出物を用いても良いし、VAM葉そのものを用いても良い。VAM葉そのものを用いる場合、VAM葉の乾燥品を用いても良いし、VAM葉の粉碎物(粉末)を用いても良い。なお、入浴剤以外の化粧品として用いるときは、VAM葉の抽出物を用いることが好ましい。

【0044】

上記VAM葉(粉末などを含む)および/またはその抽出物は、そのまま湯中に入れて使用しても良いし、或いは、これらを不織布などの多孔質袋体に入れて湯中に浸漬して揉み出しながら使用することもできる。あるいは、スプレードライ処理などにより乾燥したVAM葉などを、血行促進効果のある無機塩類(例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸ナトリウムなど)、皮膚を清浄にする無機塩類(例えば炭酸水素ナトリウム、セスキ炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウムなど)に加えて使用しても良い。

10

【0045】

(化粧水)

化粧水の種類は、柔軟化粧水、収れん化粧水、洗浄用化粧水などに大別され、化粧水の種類に応じて通常用いられる方法によって製造することができる。例えば、例えば透明化粧水(弱酸性)を構成する基材の一般的な処方例は、以下のとおりであり、有効成分としてVAM葉の抽出物を適宜添加すれば良い。ただし、本発明は下記処方例に限定する趣旨ではない。

【0046】

保湿剤(1,3-ブチレングリコールグリセリン) 6.0質量部

20

(グリセリン) 4.0質量部

エモリエント剤(オレイルアルコール) 0.1質量部

界面活性剤(POE(20)ソルビタンモノラウリン酸エステル)

0.5質量部

(POE(15)ラウリルアルコールエーテル) 0.5質量部

アルコール(エタノール) 10.0質量部

香料、色剤、防腐剤、褪色防止剤、緩衝剤 夫々、適量

精製水 78.9質量部

【0047】

精製水に保湿剤、緩衝剤、褪色防止剤を室温にて溶解して水相を得る。エタノールに防腐剤、香料、エモリエント剤、可溶化剤(界面活性剤)を入れて溶解した後、上記の水相に加えて混合し、可溶化する。その後、色剤を加えて調色後、濾過し、充填を行なう。

30

【0048】

(乳液)

乳液の種類としては、例えば、O/W型、W/O型、多層エマルションが挙げられ、乳液の種類に応じて通常用いられる方法によって製造することができる。例えば保湿・柔軟乳液を構成する基材の一般的な処方例は、以下のとおりであり、有効成分としてVAM葉の抽出物を適宜添加すれば良い。ただし、本発明は下記処方例に限定する趣旨ではない。

【0049】

油分(ステアリン酸) 2.0質量部

40

(セチルアルコール) 1.5質量部

(ワセリン) 4.0質量部

(スクワラン) 5.0質量部

(グリセロールトリ-2-エチルヘキサン酸エステル)

2.0質量部

界面活性剤(ソルビタンモノオレイン酸エステル) 2.0質量部

保湿剤(ジプロピレングリコール) 5.0質量部

(PEG1500) 3.0質量部

アルカリ(トリエタノールアミン) 1.0質量部

防腐剤、香料 夫々、適量

50

精製水 74.5 質量部

【実施例】

【0050】

以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記実施例によって制限されず、前・後記の趣旨に適合し得る範囲で変更を加えて実施することも可能であり、それらはいずれも本発明の技術的範囲に包含される。

【0051】

実施例 1

本実施例では、以下のようにして調製した V A M 葉の抽出物を用い、マウスを用いたアトピー性皮膚炎に対する予防効果を調べた。

【0052】

(抽出物の調製)

コンゴ産の V A M の葉を日干しにより十分に乾燥し、乾燥した葉 0.1 kg を乳鉢・乳棒を用いて約 2 mm のサイズに粉碎した。得られた粉碎物 1 g を抽出溶媒 (水 5 mL またはメタノール 5 mL) に浸漬し、液体窒素を用いて充分すり潰した。その後、得られた抽出液 4 mL に水 15 mL またはメタノール 15 mL を加え、エバポレーターにより、温度 : 45、圧力 : 500 hPa の条件で蒸留した後、37 で 2 時間乾燥させることにより、V A M の水抽出物または V A M のメタノール抽出物を得た。以下の実験では、各抽出物 0.5 g を 5 mL の蒸留水に溶解したものを実験に供した (濃度は 200 g / L)。

【0053】

(供試動物)

7 週齢の雄性 N C / N g a マウス 16 匹を日本エスエルシーより購入し、飼料および飲料水を自由に摂取させて 7 日間馴化させたものを実験に用いた。マウス 16 匹を、4 匹ずつ以下の 4 群に分けた。試験の前日には、小動物用バリカンを用いてマウスの腹部を剃毛した (Day 0)。

・第 1 群 (本発明例投与群) :

V A M の水抽出物 (以下、「W A T - V A M」と略記する) 投与群

・第 2 群 (本発明例投与群) :

V A M のメタノール抽出物 (以下、「M E T - V A M」と略記する) 投与群

・第 3 群 (溶媒対照群) : メタノール (以下、「V E H」と略記する) 投与群

・第 4 群 (溶媒対照群) : 水 (以下、「N O R M」と略記する) 投与群

【0054】

(試験方法)

第 1 群および第 2 群 (いずれも本発明例投与群) について、以下の処置を行なった。

【0055】

まず、剃毛した各群のマウスの腹部に、感作源として 5% 塩化ピクリルのアセトン溶液を 500 μ L 塗布して感作を行なった (Day 1)。感作後 7 日目 (Day 8) に、上記の各抽出物 (« W A T - V A M » または « M E T - V A M ») 7 mg / mL をマウスの右耳に 50 μ L 塗布 (予防処置) し、その 30 分後に、0.5% 塩化ピクリルのアセトン・オリーブオイル溶液を 50 μ L、マウスの両耳に塗布して追加感作を行なった (Day 8)。上記 Day 8 と同様の操作を、Day 14、Day 16、Day 18、および Day 20 に行い、アトピー性皮膚炎を惹起 (チャレンジ) させた。

【0056】

比較のため、第 3 群 (« V E H » 投与群) については、上記の抽出物を塗布する代わりにメタノールを塗布したこと以外は、前述した第 1 群と同様にして感作および惹起を行なった。

【0057】

一方、第 4 群 (« N O R M » 投与群) については、5% 塩化ピクリルの感作を行なわないこと、および上記の抽出物を塗布する代わりに水を塗布したこと以外は、前述した第 1 群と同様にして処置した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

(評 価)

(1) 引 っ 掻 き 行 動 の 経 時 的 変 化

Day 8、Day 14、Day 20のそれぞれにおいて、各群のマウスについて、30秒以内に観察される引っ掻き行動の回数を測定し、各群(4匹)の平均値および標準偏差を算出した。この回数が少ない程、抗搔痒効果に優れることを示している。これらの結果を図1に示す。図1には、各実験群について、左から順にDay 8、Day 14、Day 20の結果を示している。

【 0 0 5 9 】

(2) 耳 介 厚 さ (腫 脹) の 経 時 的 変 化

Day 8、Day 14、Day 20のそれぞれにおいて、各群のマウスの右耳の厚さ(μm)をデジタルノギスを用いて測定し、Day 0のマウスの右耳の厚さとの差(μm)を算出し、各群(4匹)の平均値を算出した。厚さの差が少ない程、耳腫脹抑制効果に優れることを示している。これらの結果を図2に示す。図2には、各実験群について、左から順にDay 8、Day 14、Day 20の結果を示している。

10

【 0 0 6 0 】

(3) 臨 床 症 状 の 経 時 的 変 化

Day 8、Day 14、Day 20のそれぞれにおいて、各群のマウスの背部に生じた炎症の程度を肉眼で観察し、スコアリングした。詳細には、(a)表皮剥脱/腐食の程度、(b)紅班/出血の程度、(c)purpuras(血管より漏れ出た血液により紫色の斑点状の内出血)および毛細血管拡張症の程度を肉眼で観察し、下記基準でスコアリングして各群(4匹)の平均値を算出した。スコアリング値が低い程、炎症抑制効果に優れることを示している。

20

【 0 0 6 1 】

(a) 表 皮 剥 脱 / 腐 食 の 評 価

- 0 以上、1 以下 : ほとんど変化なし
- 1 超、2 以下 : 軽度の症状
- 2 超、3 以下 : 高度の症状

【 0 0 6 2 】

(b) 紅 班 / 出 血 の 評 価

- 0 以上、10 以下 : ほとんど変化なし
- 10 超、20 以下 : 軽度の症状
- 20 超、30 以下 : 高度の症状

30

【 0 0 6 3 】

(c) purpurasおよび毛細血管拡張症の評 価

- 0 以上、1 以下 : ほとんど変化なし
- 1 超、2 以下 : 軽度の症状
- 2 超、3 以下 : 高度の症状

【 0 0 6 4 】

これらの結果をそれぞれ、図3A~図3Cに示す。

40

【 0 0 6 5 】

(4) 炎 症 細 胞 の 浸 潤

Day 14に、第1群~第3群のそれぞれにつき1例ずつ無作為に抽出したマウス左耳の一部を生検し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色による炎症細胞の同定(好中球、好酸球)を行なって病理組織標本作製した。参考のため、上記第1群において、本発明抽出物を投与する前(Day 21)のマウス(アトピー性皮膚炎マウス)左耳の一部を生検し、上記と同様にして病理組織標本作製した。図4A~図4Cに、アトピー性皮膚炎マウス(図4A)、第1群の「VAM-WAT」投与群(図4B)、第2群の「VAM-MET」投与群(図4C)におけるマウスの写真(上段)、病理組織標本の10倍拡大写真(中段)、40倍拡大写真(下段)の結果をそれぞれ示す。

50

【0066】

(5) 血清中 I g E の測定

Day 14 に、第 1 群～第 4 群のそれぞれにおいて、各群のマウスの血清中 I g E を測定した。詳細には、キットに添付されている、段階希釈した I g E 標準物質のシグナルから作製した検量線とサンプルのシグナルを比較して血清中 I g E 濃度を決定し、各群 (4 匹) の平均値および標準偏差を算出した。これらの結果を図 5 に示す。

【0067】

図 1～図 5 より以下のように考察することができる。

【0068】

まず、抗搔痒作用について考察する。図 1 より、本発明抽出物を含まずメタノールのみを投与した「VEH」(溶媒対照群)では引掻回数が多く、感作回数が進むにつれ (Day 8 Day 14 Day 20)、その回数が顕著に増加したのに対し、本発明に係る VAM の水抽出物を投与した「WAT-VAM」(本発明例)および VAM のメタノール抽出物を投与した「MET-VAM」(本発明例)は、引掻回数の顕著な抑制効果が認められ、水投与群(「NORM」)とほぼ同程度にまで抑えることができた。本発明例のなかでも特に、VAM のメタノール抽出物を投与した「MET-VAM」では非常に著しい抑制効果が認められ、感作回数が増えても引掻回数の上昇は殆ど見られなかった。よって、本発明抽出物は、極めて優れた抗搔痒作用を有していることが確認された。

10

【0069】

なお、図 1 には示していないが、本発明抽出物ではなく市販のステロイド剤(和光純薬製ハイドロコルチゾン)を用いて同様の実験を行なった場合は、メタノールのみを投与した「VEH」(溶媒対照群)の結果と殆ど変わらなかったことを確認している。

20

【0070】

次に図 2～図 5 に基づき、抗炎症作用について考察する。抗炎症作用についても前述した抗搔痒作用と同様の傾向が見られ、本発明抽出物を投与した「WAT-VAM」および「MET-VAM」は、溶媒投与群の「VEH」に比べ、耳介腫脹抑制効果(図 2)、臨床症状の緩和(図 3)、炎症細胞(好酸球および好中球)の減少(図 4)、血清中 I g E の減少(図 5)が見られ、特に VAM のメタノール抽出物を投与した「MET-VAM」では非常に著しい抗炎症効果が確認された。

30

【0071】

このうち図 4 を参照すると、アトピー性皮膚炎マウスでは症状が進行して皮膚のバリア層が破壊し(図 4 A の中段の写真を参照)、好酸球および好中球の浸潤が多く見られた(図 4 A の下段の写真を参照)のに対し、本発明抽出物を投与したものは図 4 B および図 4 C に示すように、バリア層の破壊も殆ど見られず(図 4 B および図 4 C の中段の写真を参照)、好酸球および好中球の数も減少した(図 4 B および図 4 C の下段の写真を参照)。よって、本発明抽出物は、極めて優れた抗炎症作用を有していることが確認された。

【0072】

なお、図 2～図 5 には示していないが、本発明抽出物ではなく市販のステロイド剤(和光純薬製ハイドロコルチゾン)を用いて同様の実験を行なった場合は、メタノールのみを投与した「VEH」(溶媒対照群)の結果と殆ど変わらなかったことを確認している。

40

【0073】

以上の実験結果より、本発明抽出物は、アトピー性皮膚炎の予防剤として極めて有用であることが確認された。

【0074】

実施例 2

本実施例では、実施例 1 と同様にして調製した VAM 葉の抽出物を用い、マウスを用いたアトピー性皮膚炎に対する治療効果を調べた。

【0075】

(供試動物)

50

7週齢の雄性NC/Ngaマウス30匹を日本エスエルシーより購入し、飼料および飲料水を自由に摂取させて7日間馴化させたものを実験に用いた。マウス30匹を、6匹ずつ以下の5群に分けた。試験の前日には、小動物用バリカンを用いてマウスの腹部を剃毛した(Day 0)。

・第1群(本発明例投与群)：VAMの水抽出物(「WAT-VAM」)投与群

・第2群(本発明例投与群)：VAMのメタノール抽出物(「MET-VAM」)投与群

・第3群(溶媒対照群)：メタノール(「VEH」)投与群

・第4群(溶媒対照群)：水(「NORM」)投与群

・第5群(比較群)：ステロイド(「HCT」)投与群

10

【0076】

(試験方法)

第1群および第2群(いずれも本発明例投与群)について、以下の処置を行なった。

【0077】

まず、剃毛した各群のマウスの腹部に、感作源として5%塩化ピクリルのアセトン溶液を500 μ L塗布して感作を行なった(Day 1)。感作後7日目(Day 8)、9日目(Day 10)、11日目(Day 12)、13日目(Day 14)に、0.5%塩化ピクリルのアセトン・オリーブオイル溶液を50 μ L、マウスの両耳に塗布してアトピー性皮膚炎を惹起(チャレンジ)させた。その後、Day 21、Day 23、Day 25、Day 27、Day 29にそれぞれ、上記の各抽出物(「WAT-VAM」または「MET-VAM」)7mg/mLをマウスの右耳に50 μ L塗布(治療処置)した。

20

【0078】

比較のため、第3群(「VEH」投与群)については、上記の抽出物を塗布する代わりにメタノールを塗布したこと以外は、前述した第1群と同様にして感作および惹起を行なった。

【0079】

一方、第4群(「NORM」投与群)については、5%塩化ピクリルの感作を行なわないこと、および上記の抽出物を塗布する代わりに水を塗布したこと以外は、前述した第1群と同様にして処置した。

【0080】

更にステロイド剤との対比を行なうため、第5群(「HCT」投与群)については、上記の抽出物を塗布する代わりに10mg/mLのハイドロコルチゾンを塗布したこと以外は、前述した第1群と同様にして処置した。

30

【0081】

(評価)

(1)耳介厚さ(腫脹)の経時的変化

Day 21、Day 23、Day 25、Day 27、Day 29における各群の耳介厚さ(Day 0との差)の平均値を、前述した実施例1の(2)と同様にして算出した。これらの結果を図6に示す。図6には、各実験群について、左から順にDay 21、Day 23、Day 25、Day 27、Day 29の結果を示している。

40

【0082】

(2)耳介重量の変化

Day 30の解剖時にマウスから摘出した耳の重量を、デジタル天秤にて秤量した(0.1 μ gまで)。実験群ごとに重量の平均値 \pm 標準誤差を算出し、群間の重量有意差を計算した。これらの結果を図7に示す。

【0083】

(3)臨床症状の経時的変化

Day 21、Day 23、Day 25、Day 27、Day 29のそれぞれにおいて、各群のマウスの背部に生じた扁平皮膚領域の分布を肉眼で観察し、下記基準でスコアリングして各群(6匹)の平均値を算出した。これらの結果を図8に示す。

50

0 以上、1 以下：ほとんど変化なし

1 超、2 以下：軽度の症状

2 超、3 以下：高度の症状

【0084】

(4) 炎症細胞の浸潤

Day 30 に、第 1 群、第 2 群（以上、本発明例）、第 5 群（ステロイド投与群）のそれぞれにつき 1 例ずつ無作為に抽出したマウス左耳の一部（7 mm）を生検し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色による炎症細胞の同定（好中球、好酸球）を行なって病理組織標本を作製した。参考のため、上記第 1 群において、本発明抽出物を投与する前（Day 30）のマウス（アトピー性皮膚炎マウス）左耳の一部を生検し、上記と同様にして病理組織標本を作製した。図 9 A ~ 図 9 D に、アトピー性皮膚炎マウス（図 9 A）、第 1 群の「VAM - WAT」投与群（図 9 B）、第 2 群の「VAM - MET」投与群（図 9 C）、第 5 群の「HCT」投与群（図 9 D）におけるマウスの写真（上段）と病理組織標本の 20 倍拡大写真（下段）の結果をそれぞれ示す。

10

【0085】

図 6 ~ 図 9 より以下のように考察することができる。

【0086】

図 6 より、本発明抽出物を投与した「WAT - VAM」および「MET - VAM」は、溶媒投与群の「VEH」およびステロイド投与群の「HCT」に比べ、耳介腫脹抑制効果が有意差をもって顕著に見られ（ $p < 0.05$ または $p < 0.01$ ）、特に VAM のメタノール抽出物を投与した「MET - VAM」では非常に著しい抑制効果が確認された。図 6 とほぼ同様の傾向は図 7 でも見られ、本発明抽出物を投与した群はいずれも、溶媒投与群およびステロイド投与群に比べ、有意差はないが耳重量の減少が大きく見られた。このことは、本発明抽出物を投与したマウスには、浮腫や炎症の症状が減少していることを意味する。

20

【0087】

また図 8 より、本発明抽出物を用いれば、溶媒投与群に比べて炎症症状を有意に改善でき、ステロイド投与群とほぼ同程度の改善効果が確認された。

【0088】

更に図 9 より、アトピー性皮膚炎マウスでは症状が進行して皮膚のバリア層が破壊し、好酸球および好中球の著しい浸潤が見られた（図 9 の下段の写真をご参照）のに対し、本発明抽出物を投与すると図 9 B および図 9 C に示すように、バリア層の破壊も殆ど見られず、好酸球および好中球の数も減少した。本発明抽出物による改善作用は、ステロイド投与群（図 9 D）とほぼ同程度であった。

30

【0089】

以上の実験結果より、本発明抽出物は、極めて優れた抗炎症作用を有していることが確認された。

【0090】

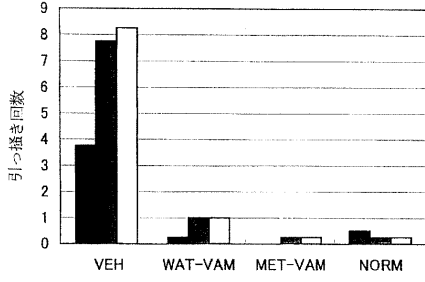
なお、上記図には示していないが、本発明抽出物を投与すると、顕著な抗掻痒効果が見られたことを実験により確認している。

40

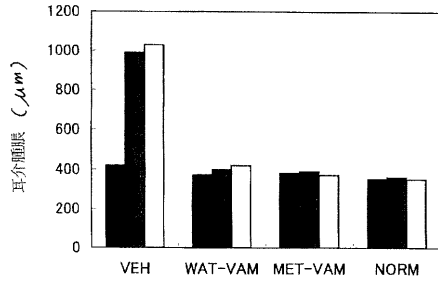
【0091】

以上の実験結果より、本発明抽出物は、アトピー性皮膚炎の治療剤としても極めて有用であることが確認された。

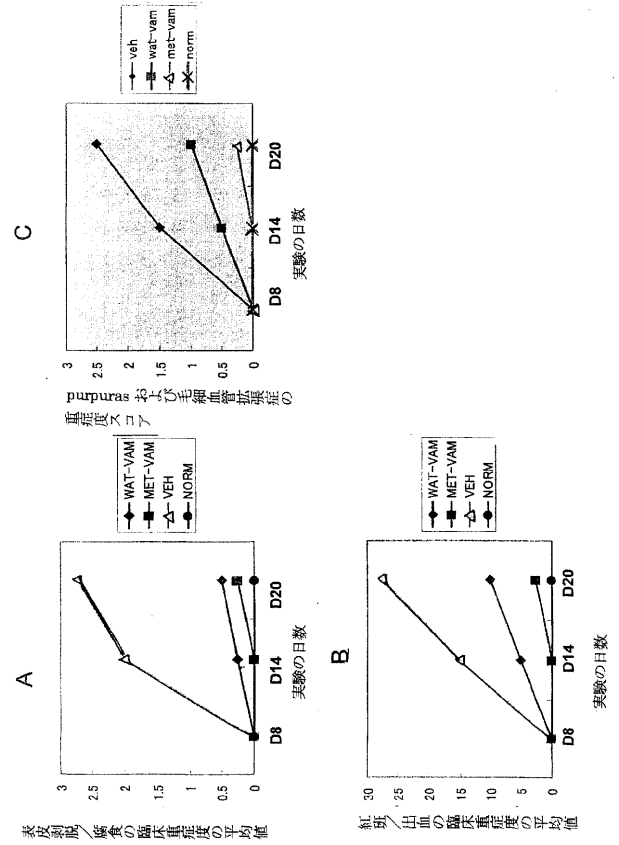
【 図 1 】



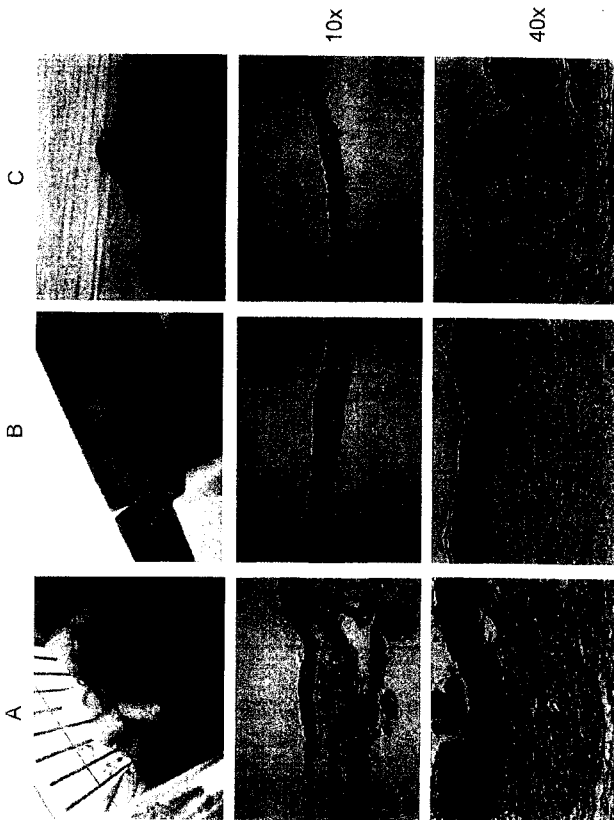
【 図 2 】



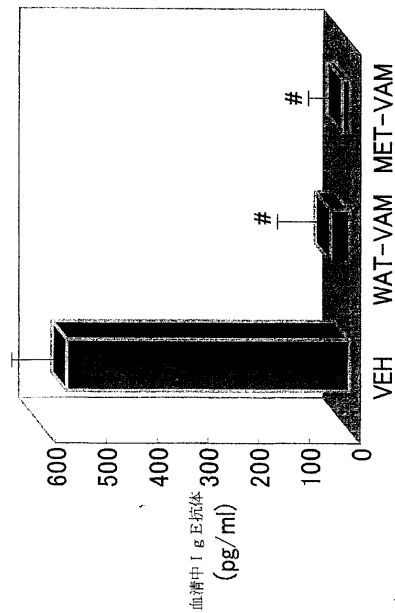
【 図 3 】



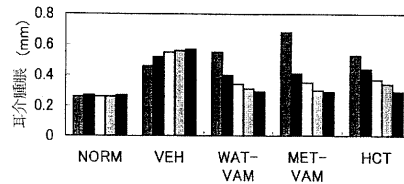
【 図 4 】



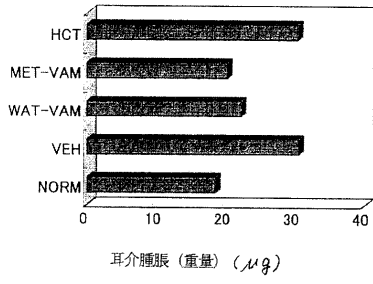
【 図 5 】



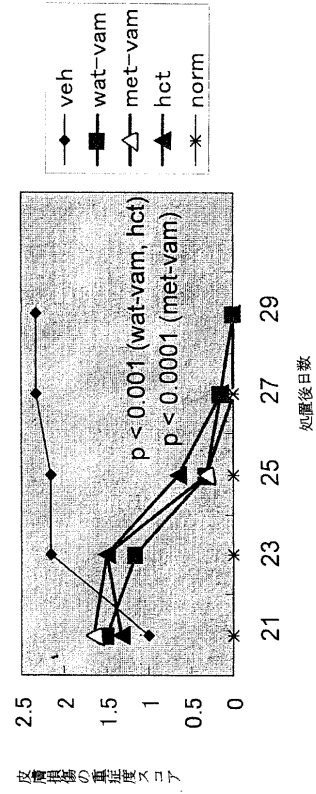
【 図 6 】



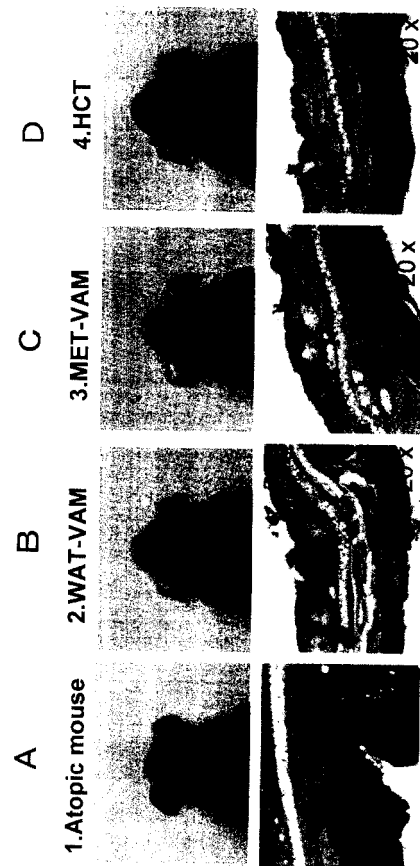
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/061910
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K36/28(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P37/08(2006.01)i, A61Q19/00(2006.01)i, A61Q19/10(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) A61K36/28, A61K8/97, A61P17/00, A61P37/08, A61Q19/00, A61Q19/10 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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Randu NGATSU et al., "Allergic Sesshoku Hifuen Yudo NC/Nga Mouse ni Taisuru Vernonia Amygdalina Chushutsueki no Koensho Sayo", Japan Society for Occupational Health Koenshu, 2010.05, vol.83rd, page 481, 12-3-015	1,2 3-5
X Y	Paul Erastoa, et. al., Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of Vernonia amygdalina growing in South Africa, Food Chemistry, 2007, Volume 104, Issue 2, Pages 636-642, 1. Introduction	2,3,5 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 29 July, 2011 (29.07.11)		Date of mailing of the international search report 09 August, 2011 (09.08.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/061910

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2009-532342 A (Panacea Biotec Ltd.), 10 September 2009 (10.09.2009), claims; paragraphs [0003] to [0007], [0062] to [0099] & US 2009/0123564 A1 & EP 2010291 A & WO 2007/113851 A2	2, 3, 5 4
Y	Hirohide TAMURA et al., "A study of bath preparations containing the garlic extract- vitamin B1 complex and Chamomile Extract: a study of its characteristics and clinical application", Fragrance Journal, 1995.07, vol.23, no.7, pages 95 to 104, page 96, column 2	3-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/061910									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K36/28 (2006.01)i, A61K8/97 (2006.01)i, A61P17/00 (2006.01)i, A61P37/08 (2006.01)i, A61Q19/00 (2006.01)i, A61Q19/10 (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. A61K36/28, A61K8/97, A61P17/00, A61P37/08, A61Q19/00, A61Q19/10											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011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) CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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	んがつ らんどう 他, アレルギ-性接触皮膚炎誘導 NC/Nga マウス に対する Vernonia Amygdalina 抽出液の抗炎症作用,	1、2									
Y	日本産業衛生学会講演集, 2010.05, Vol. 83rd, Page. 481, 12-3-015 欄	3-5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 29.07.2011		国際調査報告の発送日 09.08.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 金子 亜希	4C 3956								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3452								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/061910
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	Paul Erastoa, et. al., Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of Vernonia amygdalina growing in South Africa,	2、3、5
Y	Food Chemistry, 2007, Volume 104, Issue 2, Pages 636-642 1. Introduction 欄	4
X	JP 2009-532342 A (パナセア バイオテック リミテッド) 2009.09.10,	2、3、5
Y	請求項、段落 [0003] - [0007]、[0062] - [0099] & US 2009/0123564 A1 & EP 2010291 A & WO 2007/113851 A2	4
Y	田村 博英 他、ニンニク B1 エキス・カミツレエキス配合入浴剤 における入浴効果、 フレグランスジャーナル, 1995.07, Vol.23, No.7, Page.95-104 第96頁第2欄等	3-5

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

特許法第30条第1項適用申請有り 「産業衛生学雑誌 第83回日本産業衛生学会講演集」 発行日：平成22年5月26日 発行所：社団法人 日本産業衛生学会

(72)発明者 弘田 量二

高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

(72)発明者 ガッツ ランドゥ ロジャー

高知県高知市曙町2丁目5番1号 国立大学法人高知大学内

Fターム(参考) 4C083 AA111 AA112 CC02 CC25 EE07 EE12 EE13 EE42

4C088 AB26 AC05 BA09 BA10 MA63 NA14 ZA89

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。