

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/031833

発行日 平成27年3月23日 (2015. 3. 23)

(43) 国際公開日 平成25年3月7日 (2013. 3. 7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 9/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 3
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	4 C 0 8 4
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	4 C 2 0 6
A 6 1 K 8/34 (2006.01)	A 6 1 K 8/34	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 20 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2013-531360 (P2013-531360)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2012/071845
 (22) 国際出願日 平成24年8月29日 (2012. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-189687 (P2011-189687)
 (32) 優先日 平成23年8月31日 (2011. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

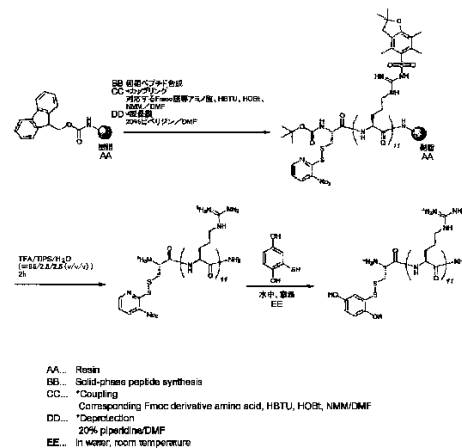
(71) 出願人 504147243
 国立大学法人 岡山大学
 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
 (74) 代理人 100098464
 弁理士 河村 洸
 (74) 代理人 100149630
 弁理士 藤森 洋介
 (74) 代理人 100111279
 弁理士 三嶋 真弘
 (72) 発明者 松井 秀樹
 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号
 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合
 研究科内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞導入ペプチドと皮膚導入促進剤とを組み合わせた皮膚導入システムおよび美白剤

(57) 【要約】

広範な薬物を効率的に皮膚各組織の個々の細胞内へ導入することを可能とする皮膚導入システムを提供すること。また、このシステムを利用した、高い美白効果を奏する美白剤を提供する。アルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加したペプチド誘導体に、皮膚導入促進剤を組み合わせることを特徴とする皮膚導入システム。ハイドロキノンにアルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを付加したハイドロキノンのペプチド誘導体を含む美白剤であって、皮膚導入促進剤との組み合わせを特徴とする美白剤。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加したペプチド誘導体に、皮膚導入促進剤を組み合わせることを特徴とする皮膚導入システム。

【請求項 2】

皮膚導入促進剤が 1 - ピレン酪酸である請求項 1 記載の皮膚導入システム。

【請求項 3】

アルギニンの残基数が 9 ~ 13 である請求項 1 または 2 記載の皮膚導入システム。

【請求項 4】

前記薬物が、タンパク質、ペプチド、低分子化合物から選択される請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の皮膚導入システム。 10

【請求項 5】

前記タンパク質が EGF P である請求項 4 記載の皮膚導入システム。

【請求項 6】

前記低分子化合物がヒドロキノンである請求項 4 記載の皮膚導入システム。

【請求項 7】

ヒドロキノンにアルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを付加したヒドロキノンのペプチド誘導体を含む美白剤であって、皮膚導入促進剤との組み合わせを特徴とする美白剤。

【請求項 8】 20

皮膚導入促進剤が 1 - ピレン酪酸である請求項 7 記載の美白剤。

【請求項 9】

医薬品、医薬部外品または化粧品に添加して用いられる請求項 7 または 8 記載の美白剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬品、医薬部外品または化粧品等に応用可能な皮膚導入システムに関する。本発明はまた、該システムを利用した美白剤に関する。

【背景技術】

【0002】 30

一般的に薬物を経皮的に吸収させる方法としては、標的薬剤に脂溶性官能基を付加し、エステルまたは界面活性剤、酵素などの試薬を同時に使用する化学的吸収促進法（特許文献 1）や、非イオン系界面活性剤、グリセリン単中鎖脂肪酸エステル、アミド化合物などの吸収促進剤と超音波を併用する方法（特許文献 2）およびマイクロニードルによる小孔形成により角質層へ吸収させる方法といった物理的吸収促進法（特許文献 3）などが挙げられる。

【0003】

しかしながら、化学的吸収促進法では、現在のところ十分な効果は得られておらず、また、物理的吸収促進法では、導入に関して装置を必要とし、さらに表皮を傷つける可能性が指摘されている。 40

【0004】

一方、アルギニンが複数個連続したアミノ酸配列を有するペプチドが生体膜通過シグナル配列として機能し、細胞膜透過性を有することが報告されている（特許文献 4）。しかしながら、皮膚に対して適用した場合、どの程度皮膚組織の各細胞内に導入されるかなどについては、これまで全く報告されていない。

【0005】

特に、分子量 500 Da 以上の化合物や非脂溶性薬物などの皮膚導入については、これまでに有効な導入システムは報告されていない。

【0006】

また、メラニン産生およびメラニン輸送のメカニズムは、その基礎研究・応用研究に従 50

事する者のみならず、広く一般の人々の間においても絶えず関心の尽きない話題である。過度の日焼けなどの紫外線の強い刺激によりチロシナーゼが異常に活性化し、メラニン合成機能が非常に高くなり、代謝しきれない量のメラニンが皮膚基底層から表皮にいたるまで残存する。これを長年繰り返すことにより、現れてくるのがシミである。

【0007】

ハイドロキノン（以下、HQとも略称する）は美白成分としてアメリカ食品医薬品局（FDA）が認めている唯一の成分であるが、肌への刺激性が非常に強いため4%を超えるものに関しては医師の処方が必要とされる。したがって、一般に市販されている化粧品などでは配合されているハイドロキノン濃度は有効濃度よりかなり低く、その効果が期待できるものではない。

10

【0008】

また、美白効果のある濃度でハイドロキノンを使用した場合、「白抜き」と呼ばれる一部分が非常に白く色素が脱色されただらになるような副作用を呈することも報告されている。これは、特に肌に敏感な女性への使用を考慮した場合、致命的な問題点となる。

【0009】

したがって、非脂溶性低分子化合物や、タンパク質などの高分子化合物など様々な有効成分をより効果的に皮膚に導入できる新たなシステムが切望されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

20

【特許文献1】国際公開第2007/119467号

【特許文献2】特開平11-335271号公報

【特許文献3】特開2004-501725号公報

【特許文献4】特開2003-252898号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、広範な薬物を効率的に皮膚の各組織の個々の細胞内へ導入することを可能とする皮膚導入システムを提供することである。また、このシステムを利用した、高い美白効果を奏する美白剤を提供することも目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者が検討したところ、これまで知られているポリアルギニンやTATのタンパク質導入ドメインなどの細胞透過性シグナル配列を使用するだけでは、薬物を皮膚の各層のバリアを通過させて皮膚内へと導入することは可能でも、薬物が細胞と細胞の間の細胞間隙に存在してしまい皮膚の個々の細胞内への導入は困難であった。それにもかかわらず、驚くべきことに、アルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加し、1-ピレン酪酸などの皮膚導入促進剤を併用した場合には、該薬物の優れた、皮膚組織、とりわけ表皮および真皮から皮下組織、筋層までのそれぞれの細胞への導入・拡散が可能となることを見出し、本発明が完成された。

40

【0013】

すなわち、本発明は、アルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加したペプチド誘導体を、皮膚導入促進剤と組み合わせることを特徴とする皮膚導入システムに関する。本発明において、アルギニンは9～13残基がより好ましく、11残基が最も好ましい。

【0014】

また、本発明に使用する皮膚導入促進剤としては、1-ピレン酪酸が好ましい。

【0015】

さらに、本発明の皮膚導入システムは、医薬品、医薬部外品または化粧料などの有効成分のように経皮吸収が望まれる広範な薬物に応用することができる。

50

【0016】

また、本発明は、ハイドロキノンにアルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを付加したペプチド誘導体を皮膚導入促進剤との組み合わせることを特徴とする新規美白剤に関する。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、皮膚組織、とりわけ表皮および真皮から皮下組織までの細胞に広範な薬物を導入・拡散することが可能となる。また、本発明の皮膚導入システムは、経皮的な直接作用により効果的に薬物を導入できるため、薬剤を塗布したところにだけ局所的に強力な薬物作用を誘導することができる。

10

【0018】

本発明の美白剤は、ハイドロキノンの濃度を低く、たとえばハイドロキノン単独での有効濃度の約100分の1程度に抑えることができ、それによりハイドロキノンの副作用である皮膚刺激や白抜きなどを抑えることができる。本発明の美白剤は、経皮的な直接作用が可能であるため、薬剤を塗布したところだけ局所的に強力な美白効果を誘導することができる。

【0019】

さらには、本発明の美白効果は、陰性対照であるコントロールおよび陽性対照であるハイドロキノンのみならず、ランダムなペプチドを使用した群とも比較検討して裏付けられたものであり、従来他剤にはない、根拠に基づいた医療(EBM)に即した美白剤として用いることが可能である。

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の美白剤の合成スキーム例である。

【図2】モルモットの皮膚に対する美白効果を評価する写真データである。(a)が治療前、(b)が治療後の写真である。

【図3】ヘマトキシリン・エオジン染色を施した組織の顕微鏡像である。

【図4】フォンタナ・マッソン染色を施した組織の光学顕微鏡像である。

【図5】図4の組織におけるメラニン陽性細胞数を示すグラフである。

【図6】HQおよびHQ-11R投与による、B16マウス悪性黒色腫瘍細胞におけるメラニン量の測定結果を示すグラフである。

30

【図7】B16マウス悪性黒色腫瘍細胞におけるEGFP導入を評価する蛍光顕微鏡像である。

【図8】モルモットの皮膚におけるEGFP導入を評価する蛍光顕微鏡像である。

【図9A】免疫組織染色による1-ピレン酪酸併用群および1-ピレン酪酸非併用群のEGFP-11Rの組織内分布を示す蛍光顕微鏡像である。

【図9B】図8Aの蛍光顕微鏡像の青色に染色された核染色部分のスケッチである。

【図9C】図8Aの蛍光顕微鏡像の緑色に蛍光を発しているEGFP部分のスケッチである。

【図10】1-ピレン酪酸併用EGFP-11R群の経皮導入効果を示す皮膚組織の蛍光顕微鏡像である。

40

【図11】MBTH法によるチロシナーゼ活性の測定結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明の皮膚導入システムは、アルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加したペプチド誘導体に皮膚導入促進剤を組み合わせることを特徴とする。

【0022】

連続するアルギニンの残基数としては9～13が好ましく、11が最も好ましい。アルギニン残基が2以下または14以上であると、薬物の皮膚からの導入効率が悪くなる傾向

50

がある。アルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドは、細胞増殖に影響を及ぼすことなく、また細胞障害性も示さないため、安全な薬剤である。

【0023】

本明細書において、「付加した」との記載は、薬物がペプチドやタンパク質である場合には、アミノ酸同士のアミド結合を一般的には意味するが、そのアミド結合に限定されるものではない。そして薬物がペプチドやタンパク質である場合、このペプチド誘導体は、通常的人工合成法のみならず、遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。たとえば、数個のアルギニンが連続する配列および薬物のアミノ酸配列をコードするDNAを挿入した組換えベクターを作製し、適当な宿主細胞に組換えベクターを導入後、その宿主細胞を培養する。ついで、培養物を回収することにより、ペプチド誘導体を得ることができる。製造後、得られたペプチド誘導体は公知の方法で精製することもできる。これらのペプチド誘導体の製造法および精製法は、本分野において一般的な手法であり、当業者により容易に実施されるものである。また、薬物がアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質以外の有機化合物である場合、薬物とアルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドとの結合は、同等の活性を有する限り、たとえばシステインなどの他のアミノ酸や他の化学結合を介して行なうことができ、アルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドと薬物との間には、たとえば 1 ~ 20 個、または 1 ~ 10 個、または 1 ~ 3 個のアミノ酸残基が挿入されていてもよい。システインを利用する場合には、たとえば反応性のニトロピリジンスルフェニル (NPYS) 基などを用いて様々な薬物と容易に S-S 結合により連結することができる。

10

20

【0024】

本発明の皮膚導入システムは、低分子化合物、ペプチド、タンパク質など広範な薬物に適用でき、特に限定されるものではない。たとえば表皮、真皮、皮下組織から筋層にかけて導入されることが望まれるようなタンパク質や生理活性ペプチド、低分子化合物などが挙げられる。最も好ましい薬物としては、ハイドロキノンやその類似化合物、EGFPなどの分子量 30 kDa 程度の非常に大きなタンパク質などが挙げられる。美白剤に使用する場合など、HQ 以外のチロシナーゼ抑制効果を有する低分子製剤にも適用することができる。

【0025】

また、本発明の薬物のペプチド誘導体には、有効成分である薬物以外に、皮膚研究のモデルに使用する場合など、細胞内に導入されたことを確認するためのマーカーを含有しても良い。マーカーは、特に限定されるものではなく、たとえば、フルオレセインイソチオシアネート (以下、FITC と略称する)、ローダミンなどの蛍光色素、および GFP などの蛍光タンパク質を使用することができる。

30

【0026】

もちろん現在使用されている、経皮用薬物にアルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを付加し、皮膚導入促進剤と組み合わせることにより、飛躍的にその導入効果を増大することができる。

【0027】

本発明において使用される「皮膚導入促進剤」としては、高い疎水性を有する負に帯電したカウンターアニオンを使用することができ、具体的には 1-ピレン酪酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。皮膚導入促進剤を、薬物のペプチド誘導体と組み合わせる方法としては、特に限定されるものではないが、薬物のペプチド誘導体の塗布前、好ましくは直前 ~ 60 分前、より好ましくは 1 ~ 30 分前、最も好ましくは 2 ~ 10 分前に皮膚導入促進剤により前処理することができる。

40

【0028】

本発明の用途は、医薬品類はもとより、医薬部外品類、化粧品類等、経皮吸収を目的とするものであれば、どのような薬物にも適用可能である。

【0029】

また、本発明の美白剤は、ハイドロキノンにアルギニン 3 ~ 13 残基が連続したアミノ

50

酸配列からなるペプチドを付加したペプチド誘導体を皮膚導入促進剤と組み合わせることを特徴とするものである。臨床の現場では、4～10%程度のハイドロキノン濃度が、美白効果を得るために必要であると報告されているため、今回使用した0.2%ハイドロキノン量のHQ-11Rは、ハイドロキノン単体と比較した場合、約20～100倍程度の強いチロシナーゼ抑制効果を示し、日焼け後の美白および日焼けの予防のいずれの用途にも使用することができる。つまり、ハイドロキノンの実質的な使用量を約20分の1～約100分の1程度に抑えることができる。

【0030】

さらに、本発明の美白剤において、有効成分であるハイドロキノンのペプチド誘導体は、メラニン沈着抑制研究のモデルに使用する場合など、細胞内に導入されたことを確認するためのマーカーを含有しても良い。マーカーは、特に限定されるものではなく、たとえば、フルオレセインイソチオシアネート（以下、FITCと略称する）、ローダミンなどの蛍光色素、およびGFPなどの蛍光タンパク質を使用することができる。

10

【0031】

本発明において、有効成分である薬物のペプチド誘導体は、通常的人工合成法によって、または一般に市販されている人工合成機によってペプチド部分を製造し、通常的人工合成法などの一般的な方法により薬物を付加することにより製造することができる。製造後、得られたペプチド誘導体は、公知の方法で精製することもできる。これらのペプチド誘導体の製造法および精製法は、本分野において一般的な手法であり、当業者により容易に実施されるものである。

20

【0032】

たとえば、薬物がハイドロキノンの場合、ペプチドの固相合成によりアルギニンを1残基ずつカルボキシル末端側から結合させ、所望の残基数結合した後、ニトロピリジンスルフェニル(NPYS)基などの反応性の側鎖を有するシステイン残基を1つ導入する。その後定法にて脱保護および精製したのち、メルカプトハイドロキノンと反応させ、システイン残基にハイドロキノン結合させ、精製して本発明のハイドロキノンのペプチド誘導体を得ることができる(図1)。

【0033】

本発明の皮膚導入システムの有効成分である薬物のペプチド誘導体や皮膚導入促進剤の剤形は、投与方法によって適宜設定することができる。具体的には、水溶液や乳液などの液剤、および軟膏などを例示することができる。

30

【0034】

本発明の皮膚導入システムは、有効成分である薬物のペプチド誘導体と皮膚導入促進剤とを組み合わせた皮膚導入製剤として用いることができる。また、本発明の皮膚導入システムは、その投与方法に合わせて、有効成分である薬物のペプチド誘導体と皮膚導入促進剤とを含有するキットの態様にもできる。

【0035】

本発明の皮膚導入システムの有効成分である薬物のペプチド誘導体の濃度は、使用する薬物、剤形、使用する基材などにあわせて適宜設定することができる。たとえば、薬物としてハイドロキノンを用い、親水性軟膏とする場合、薬物のペプチド誘導体の濃度は0.2～20mg/gであることが好ましい。

40

【0036】

本発明の皮膚導入システムは、有効成分である薬物のペプチド誘導体の他に、適当な薬学的に許容され得る賦形剤、担体、溶媒、ゲル形成剤、酸化防止剤、希釈剤、等張化剤、pH安定化剤など、本技術分野において通常用いられている成分を添加してもよい。これらの添加剤は、通常当業者により適宜選択される。

【0037】

本発明の薬物のペプチド誘導体を添加する医薬品、医薬部外品または化粧品としては、どのようなものでも使用することができ、特に限定されるものではないが、皮膚導入促進剤と組み合わせることによりその効果を発揮することができる。

50

【0038】

以下、実施例によって、本発明の皮膚導入システムをさらに詳細に説明するが、本発明はその趣旨と適用範囲から逸脱しない限りこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0039】

製造例 1

(A) 保護ペプチド樹脂の構築

ペプチド自動合成機(433A、アプライドバイオシステム(Applied Biosystems)社製)を用いて添付のソフトにしたがい、固相合成法により1個ずつアミノ酸をカルボキシル末端側から結合させBoc-Cys(Npy s)-[Arg(Pbf)]₁₁-樹脂の合成を定法にて行なった。

10

【0040】

(B) 脱保護と樹脂からの切り出し

精製後、脱保護を行い、樹脂から切り出し、Cys(Npy s)-[Arg]₁₁-NH₂を得た。

【0041】

(C) ハイドロキノンへの付加

(B)で得られた、Cys(Npy s)-[Arg]₁₁-NH₂(60mg)を純水(1.2ml)に溶解し、2-メルカプトヒドロキノン(3.6mg、0.8当量)をアルゴン気流中で室温にて攪拌しながら添加した。一昼夜反応後、反応溶液を直接分取精製に供した。

20

【0042】

得られた粗精製物をHPLC分取装置(LC-8A-1、島津製作所製、カラム:ODS30×250mm)を用いて0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルの系で分取精製し、目的のペプチド誘導体の分画を得、アセトニトリルを留去した後、凍結乾燥粉末とし、目的物であるヒドロキノンのペプチド誘導体(HQ-11Rと略称する)25mgを得た。

ヒドロキノンの配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドを結合させたもの(HQ-GLHFPHIYVRD)も同様に製造した。

【0043】

30

製造例 2

構築したpet21a EGFP-11Rプラスミドを大腸菌BL21株に形質転換した、その後、単一のコロニーをピックアップし、100mLのLB-Amp培地にて37℃で一晩培養した。これを1LのLB-Amp培地に加えて、OD600が0.6になるまで37℃で培養した。その後、IPTGを終濃度0.1mMになるように加え、pET21a-EGFP-11Rについては25℃で一晩培養した。培養後、発現誘導した培養液を集菌した(8,000rpm、10分、4℃)。続いて、8M尿素、20mM MEPE S、100mM NaClを含む溶菌バッファーを30mL加えて懸濁させた後、超音波菌体破碎を行った(クボタ、Isonater 201M)。破碎後、溶液を12,000rpm、15分、4℃で遠心し、上清を回収した。回収した上清を溶菌バッファーで平衡化したリジンビーズ(インビトロジェン、ProBond Resin)と反応させた。その後、8M尿素、20mM MEPE S、100mM NaCl、20mM イミダゾールを含む洗浄バッファーで3回洗浄した。洗浄後、8M尿素、20mM MEPE S、100mM NaCl、200mM イミダゾールを含む溶出バッファーで溶出し、回収した。

40

【0044】

回収したタンパク質溶液中のイミダゾールを除去するために、Slide-A-Lyzer(登録商標)Dialysis Cassette(Extra Strength)(テルモ SCIENTIFIC)により透析を行った。透析用のバッファーとして、1000倍量のPBSを使用した。透析は6時間を2回行なった。最終的に、目的の濃度に

50

なるように限外濾過法にてタンパク濃縮を行った。

【0045】

実施例1：褐色モルモットを用いた美白効果の検討

実験には、褐色モルモット(Weiser-Maples、8週齢、雌、各群n=5)を使用した。褐色モルモットは、表皮基底層に色素細胞を有しており、ヒトの皮膚と似ている。紫外線照射により、ヒトと同様の皮膚反応を示し、メラニン色素の沈着を形成する。そのため、美白効果のアッセイに用いることができる。

【0046】

脱毛した褐色モルモットの背中をパリカン(ER509、松下電工)および除毛クリーム(epilat, Kracie)により脱毛した。脱毛した褐色モルモットの背中に、照射面積を一
10
区画6cm²で4区画設定し、紫外線UVB強度測定装置(VLX-3,W、アトー株式会社製)にてUV強度を測定しつつ、UV照射機(MODEL UVM-57、フナコシ)により、1日1回紫外線量0.015J/s/cm²を5日間照射し、2日間休んでさらに5日間照射した。日焼けモデルを作製後、プロピレングリコールにて調整した500μMの1-ピレン酪酸50μLを塗布し、5分後、プロピレングリコールにて調整した500μMのHQ-11R、HQ、HQに配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドを結合させたもの(HQ-GLHFPHIYVRD)およびPBS(陰性対照)を1回につき50μLずつ塗布した。

【0047】

投与スケジュールは、5日間連続塗布(1日1回)-2日休薬-再度5日間塗布(1日
20
1回)-2日休薬、とした。

【0048】

結果、外観にてHQ-11Rを用いた群の塗布部分のみが効果的な美白作用を示した(図2)。

【0049】

さらに、美白効果を顕微鏡下で詳細に検討するために、ヘマトキシリン・エオジン染色とフオンタナ・マッソン染色後、光学顕微鏡(x40)にて観察し、組織障害およびリンパ球の浸潤、メラニン含有細胞について後述する手順で評価を行なった(図2、図3、図4)。HQ-11R群の塗布部分の組織においては、他の群と同様、アレルギー反応やリンパ球浸潤などの細胞・組織障害性は認められず、4群間において有意な差は認められな
30
かった(図3)。フオンタナ・マッソン染色においてメラニン含有細胞数を確認したところ、明らかにHQ-11R群の塗布部で有意に陽性細胞、すなわちメラニン含有細胞4が減少していた(図4)。図4のメラニン含有細胞数を各群20視野にて観測し、スチューデントT検定にて、他の群と統計学的に評価したところ、HQ-11R群が有意差(p<0.01)をもって他群よりもメラニン含有細胞の減少を認めた(p<0.01、図5)。

【0050】

(免疫染色)

新鮮凍結切片を、4%PFAにて10分間固定した。PBSにて3回洗浄した。ブロッキング緩衝液(PBSで調整した5%BSAおよび0.3%トリトン)にてブロッキング
40
を行った。PBSにて1回洗浄した。濃度1ug/mlとなるようPBS中10%BSAにて調整した一次抗体を添加し、4、16時間静置した。PBSにて3回洗浄した。濃度1ug/mlとなるようPBS中10%BSAにて調整した二次抗体を添加し、暗所、室温で2時間静置した。PBSにて3回洗浄した。ヘキストを添加し、暗所で1分間染色した。PBSにて3回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【0051】

(フオンタナ・マッソン染色)

パラフィン切片を作製し、キシレンに5分間、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノールおよび70%エタノールを順に各1分間滴下した。水洗し、10%フ
50
オンタナアンモニア銀染色液を滴下し、遮光して16時間静置した。水洗し、0.25%

チオ硫酸ナトリウム水溶液を1分間滴下した。水洗し、ケルンエヒトロート液を5分間滴下した。水洗し、70%エタノール、90%エタノール、95%エタノールおよび100%エタノールを順に各1分間滴下した。キシレンを5分間滴下し、封入し観察した。

【0052】

(フォンタナ・マッソン染色によるメラニン陽性細胞数の計測)

フォンタナ・マッソン染色を行ったサンプルについて、各サンプルにつき顕微鏡にて基底層をランダムに10箇所撮影し、各箇所でのメラニン陽性細胞の個数を計測した。

【0053】

実施例2：メラニン含有量に対するHQ-11Rの阻害効果

【0054】

マウス悪性メラノーマ細胞B16細胞(Mouse B16 melanoma 4A5、ECACC)を用いて細胞内のメラニン量に対する効果を評価した。B16細胞は、マウスの皮膚に発生した悪性黒色腫瘍細胞であり、特異的なメラニン産生能を有している。そのため、メラニン合成に関わる機能調節やメラニン産生抑制物質検索のための研究材料として汎用されている。B16細胞は10%(v/v)ウシ胎児血清(ギブコ、カールスバッド、CA、米国)、100単位/mlペニシリン(ギブコ)、100μg/mlストレプトマイシン(ギブコ)、および0.2%L-グルタミン(ギブコ)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ギブコ)を用いてプラスチックディッシュ(直径10cm、コーニング、グレンデール、AZ、米国)中で、37℃、5%CO₂下で培養した。6ウェルプレートにB16細胞を1ウェルあたり1×10⁵個播種し、前述の培地を用いて37℃、5%CO₂下で培養後、最終濃度が50μMとなるように、PBSにて希釈した1-ピレン酪酸を添加し、37℃、5%CO₂下で2分間培養した。その後、PBSにて希釈したHQ、HQ-11R、HQに配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドを結合させたもの(HQ-GLHFPHIYVRD)を最終濃度が各10、20および30μMになるように添加し(対照群は、PBSのみ添加)、24時間培養した後、1N NaOHを0.5ml加えて80℃で1時間メラニン可溶化処理を行い、吸光光度計にて415nmの波長で測定した。

【0055】

結果を対照との比として図6に示す。HQ単独およびHQ-11R投与された細胞ではメラニン量が顕著に減少していた。また、HQ-GLHFPHIYVRD投与群では、HQと同等の効果は得られず、20μMまでほとんどメラニン量に変化はみられなかった。さらに11Rのみ投与している群では、メラニンの減少は全く認められなかった。これにより、細胞レベルにおいては、HQ-11RはHQと同等またはそれ以上のメラニン減少効果が認められた。

【0056】

実施例3：アルギニン11残基が連続したアミノ酸配列にEGFP(高感度緑色蛍光タンパク質:enhanced green fluorescence protein)を付加した化合物(EGFP-11R)についての検討

【0057】

(A)細胞膜通過作用の評価

マウス悪性メラノーマ細胞B16細胞(Mouse B16 melanoma 4A5、ECACC)を用いて、細胞膜通過作用に対する評価を行なった。B16細胞は10%(v/v)ウシ胎児血清(ギブコ、カールスバッド、CA、米国)、100単位/mlペニシリン(ギブコ)、100μg/mlストレプトマイシン(ギブコ)、および0.2%L-グルタミン(ギブコ)を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(ギブコ)を用いてプラスチックディッシュ(直径10cm、コーニング、グレンデール、AZ、米国)中で、37℃、5%CO₂下で培養した。コンフルエント状態にまで培養した細胞を回収し、10分の1量の細胞を3mlの新しい培地を含む35mmガラスボトムディッシュ(松浪硝子工業株式会社)に播き培養を続け、翌日のEGFP導入観察に用いた。

【0058】

10

20

30

40

50

B 1 6 細胞を培養したガラスボトムディッシュを P B S にて 2 回洗浄した。ついで、1 - ピレン酪酸処理群には P B S にて希釈した 6 7 m M 1 - ピレン酪酸を最終濃度が 5 0 μ M となるように添加し、3 7 ° C 、 5 % C O₂ 下で 2 分間培養した後、最終濃度 5 μ M となるように、P B S で希釈した製造例 2 で得られた E G F P - 1 1 R を添加した。もう一群には、最終濃度 5 μ M となるように、P B S にて希釈した E G F P - 1 1 R を添加した。どちらも 3 7 ° C 、 5 % C O₂ 下で 2 分間培養した後、P B S にて 2 回洗い、培養培地に置き換え、0 . 5 、 2 、 4 、 8 時間ごとに共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【 0 0 5 9 】

1 1 個のアルギニンである 1 1 R を融合したタンパク質 E G F P - 1 1 R 5 は、細胞膜を通過して、細胞内に局在し、1 1 R を付加していない E G F P は、細胞内へと導入されなかつた。また、6 7 μ M の 1 - ピレン酪酸で 2 分間処理を行い、E G F P - 1 1 R を同量加えた群は、細胞内に導入され、より細胞内での緑色蛍光物質の拡散の増強が認められた (図 7) 。

10

【 0 0 6 0 】

(B) モルモット皮膚への E G F P - 1 1 R 導入

実験には褐色モルモット (Weiser-Maples、8 週例、雌、n = 5) を用いた。モルモットの背中をバリカン (E R 5 0 9 、松下電工) および除毛クリーム (epilait, Kracie) により脱毛した。プロピレングリコールに溶解した 5 0 0 μ M の 1 - ピレン酪酸を 5 0 μ L ずつモルモット皮膚 6 c m² あたり塗布した。5 分後、同じ部位にプロピレングリコールに溶解した E G F P - 1 1 R (5 0 μ M) および E G F P (8 0 μ M) を 5 0 μ L ずつ塗布した。塗布後 0 . 5 時間、2 時間、4 時間、8 時間、2 4 時間ごとにデルマパンチ (3 m m 、マルホ株式会社) を用いて皮膚サンプルを採取した。新鮮凍結切片 (厚さ 1 0 μ m) を作成後、ローダミン ファロイジン、D A P I により染色を行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。E G F P 6 のみでは、皮膚への導入は見られなかつた。E G F P - 1 1 R のみの塗布群では、E G F P - 1 1 R 5 は皮膚組織へと導入されたが、皮膚の細胞内へは導入されずに皮膚構成細胞間隙に局在し組織全体 (表皮・真皮・皮下組織) への拡散は認められなかつた (図 8) 。1 - ピレン酪酸と E G F P - 1 1 R との組み合わせ群では皮膚塗布後 0 . 5 時間より、表皮・真皮・皮下組織全体へ拡散し、4 ~ 8 時間でピークに達し、2 4 時間後でも皮膚内に残存していることを確認した (図 9 および図 1 0) 。図 1 0 中、白く光って観察される部分が E G F P - 1 1 R が存在する部分である。

20

30

【 0 0 6 1 】

参考例 1 : 細胞生存能の評価

9 6 ウェルプレート (I W A K I 、 A G C テクノグラス株式会社) 5 枚に B 1 6 細胞を 3 7 ° C 、 5 % C O₂ 下で 1 ウェルあたり 5 0 0 個培養した。1 6 時間後、P B S にて希釈したハイドロキノン (シグマ - アルドリッチ) および H Q - 1 1 R を 5 0 0 n M 、 5 μ M 、 5 0 μ M となるように添加し、3 7 ° C 、 5 % C O₂ 下で静置した。0 、 2 4 、 4 8 、 7 2 時間ごとにプレートを室温に平衡化し、調整した Cell Titer-Glo 試薬 (Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay、プロメガ) を、各ウェルに培地と等量添加した。シェーカーで 2 分間攪拌し、室温で 1 0 分間静置している間に、各ウェルをホワイトプレート (マイクロプレート 9 6 - ウェル P swhite、Porvair advanced materials) に移した。ルミノメーター (MicroLumat Plus LB 96V、Berthold technologies) にて発光シグナルを測定した。

40

従来のハイドロキノン投与群と比較し、毒性その他に関しては H Q - 1 1 R 投与群との間に有意な差は無く、1 1 R を付加したことによる新たな有害事象は認めなかつた。

【 0 0 6 2 】

参考例 2 : M B T H によるチロシナーゼ活性の測定

9 6 ウェルプレートに B 1 6 細胞を 1 ウェルあたり 5 0 0 0 個播き、3 7 ° C 、 5 % C O₂ 下で 1 2 時間培養した。培養液を捨て、P B S にて希釈した 1 % トリトン X - 1 0 0 、 0 . 1 % L - D O P A (3 , 4 - ジヒドロキシ - L - フェニルアラニン) および 2 0

50

7 mM MBTH (3 - メチル - 2 - ベンゾ - チアゾリノンヒドラゾン塩酸塩一水和物、和光純薬工業株式会社) をそれぞれ 1 ウェルあたり 50 μL 添加し、5.0 μM、50 nM または 500 nM の HQ - 11R を 1 ウェルあたり 50 μL 添加した後、37 °C で 2 時間培養した。マイクロプレートリーダー (MTP - 300、コロナ電気株式会社) を用いて OD 492 nm 吸光度を測定した (参考文献: Winder AJ., et al., Eur J Biochem. 1991 Jun 1; 198(2):317-326)。

結果を図 11 に示す。HQ - 11R は濃度依存的にチロシナーゼ活性を阻害した。

【符号の説明】

【0063】

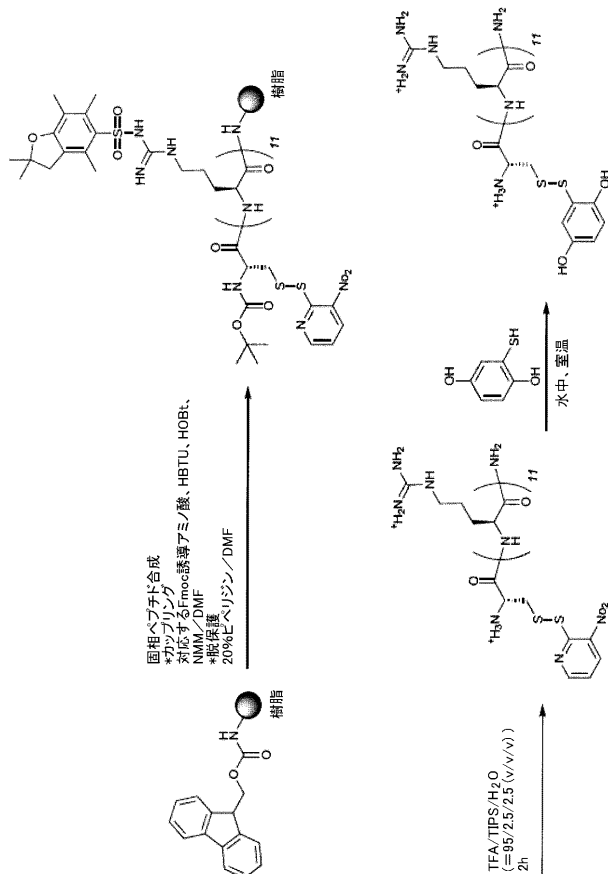
- 1 角質層
- 2 表皮
- 3 真皮
- 4 メラニン含有細胞
- 5 EGFP - 11R
- 6 EGFP

【配列表フリーテキスト】

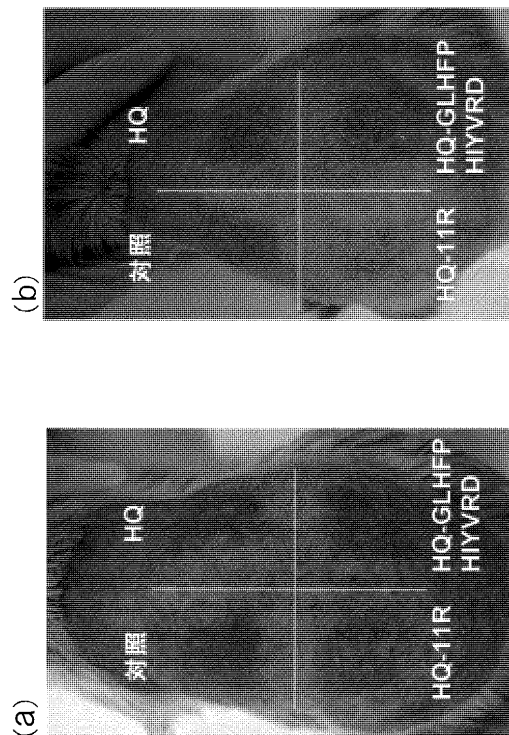
【0064】

配列番号 1 : 人工的なランダムなアミノ酸配列を有するペプチド

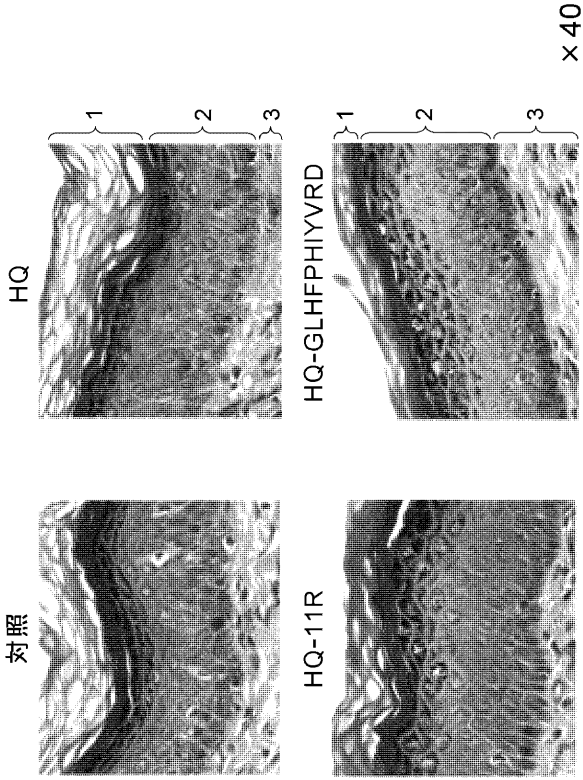
【図 1】



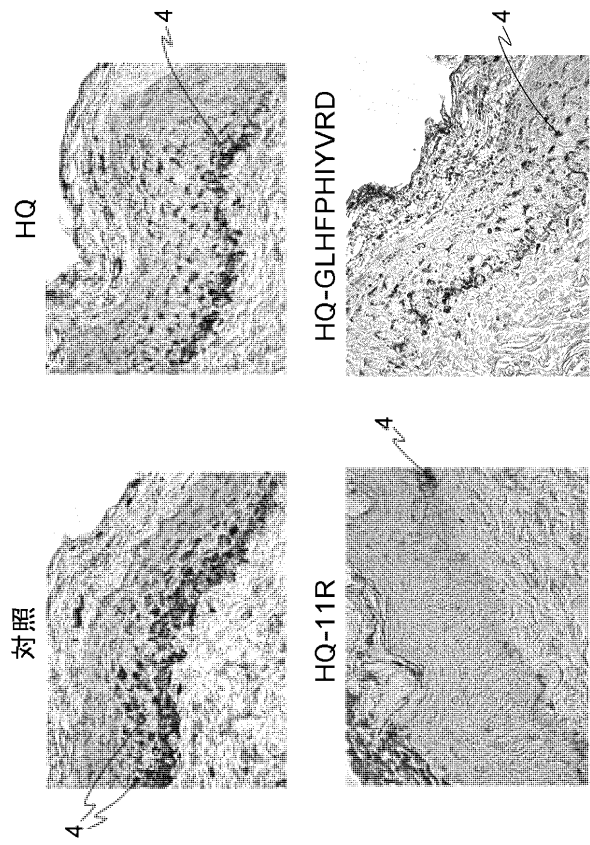
【図 2】



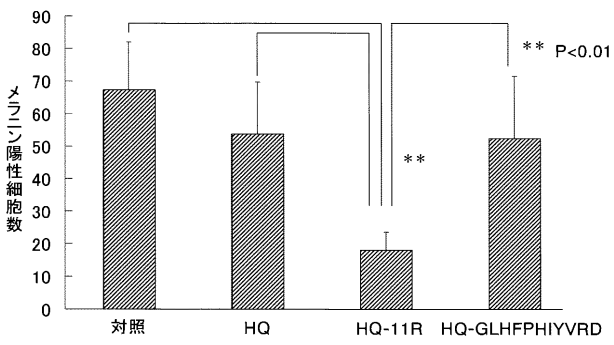
【 図 3 】



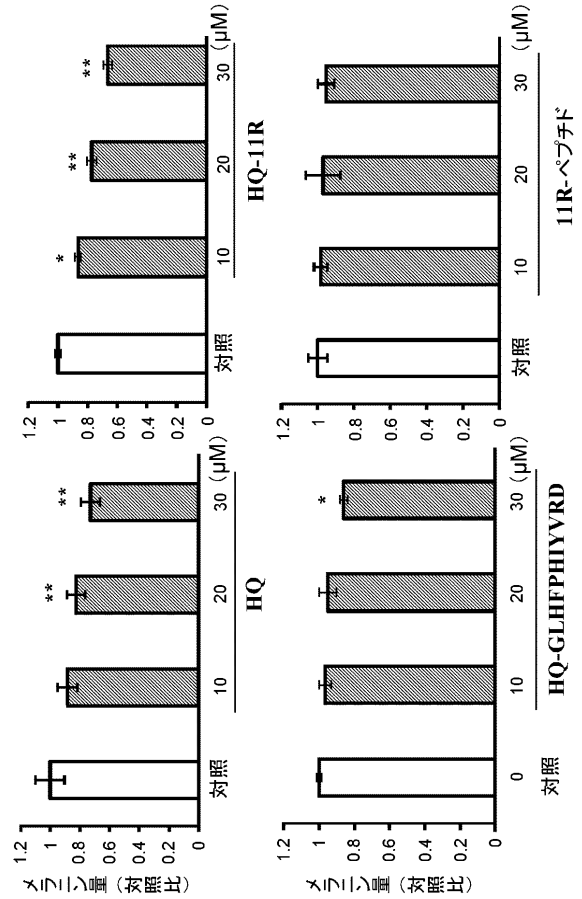
【 図 4 】



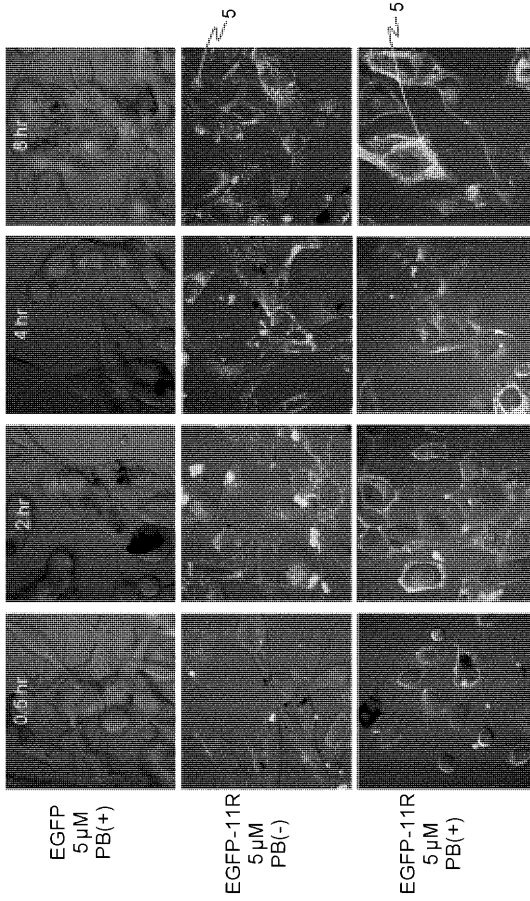
【 図 5 】



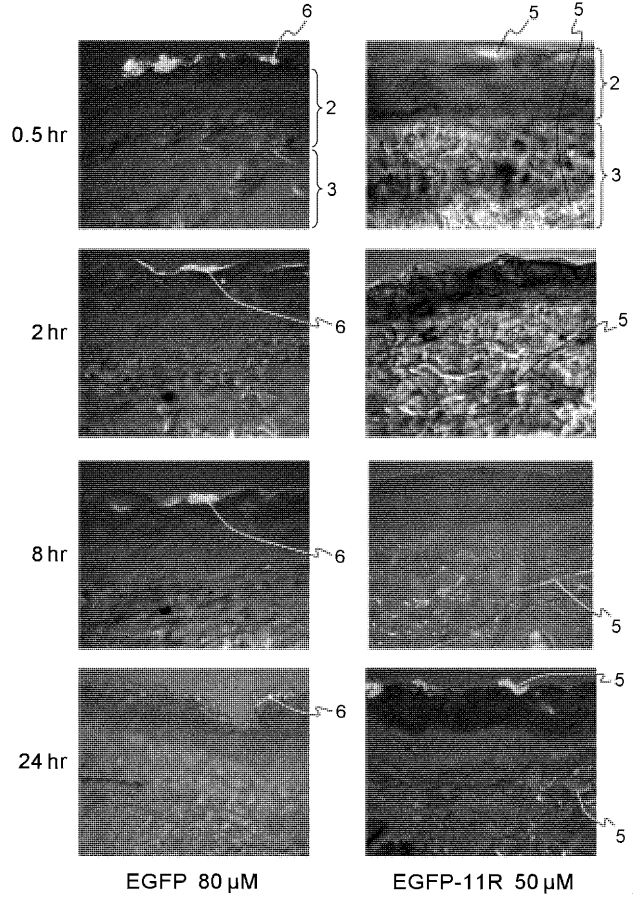
【 図 6 】



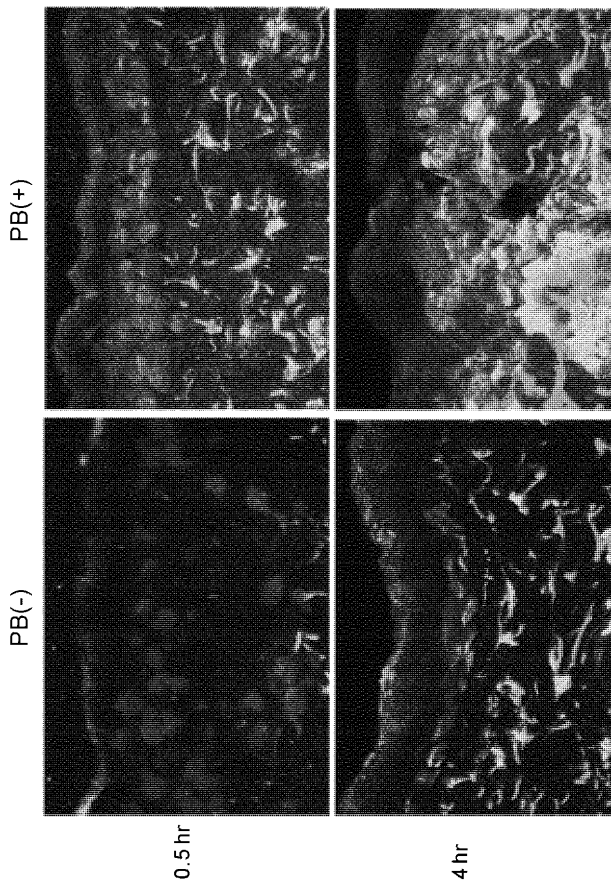
【 図 7 】



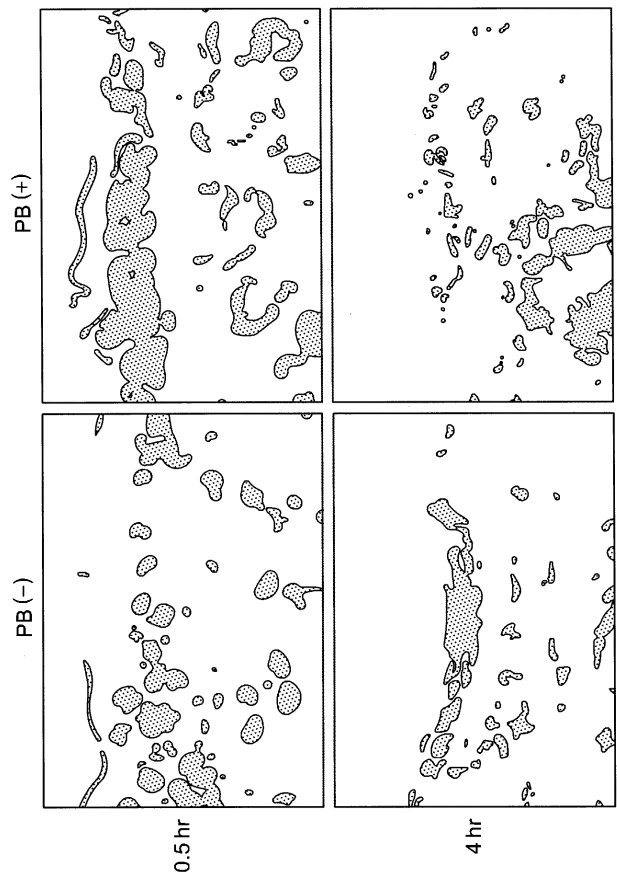
【 図 8 】



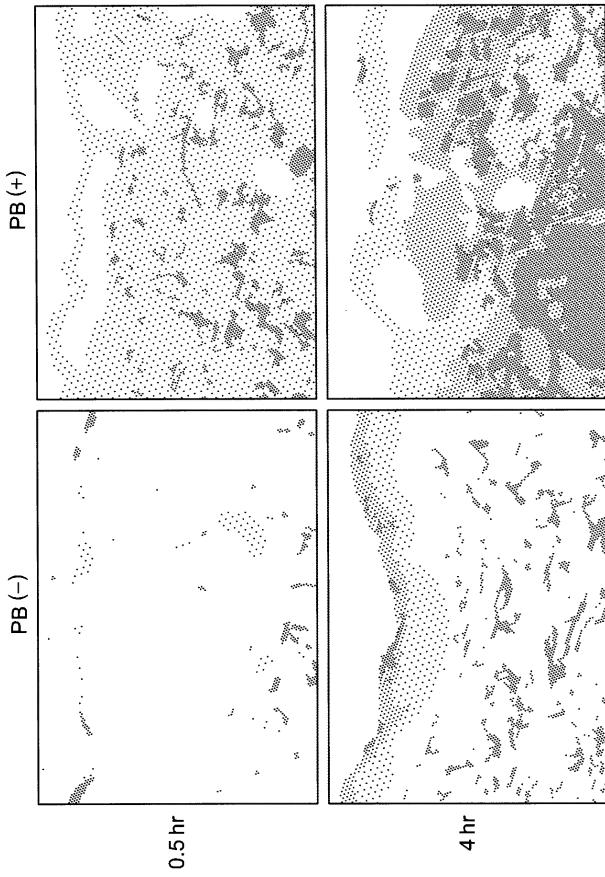
【 図 9 A 】



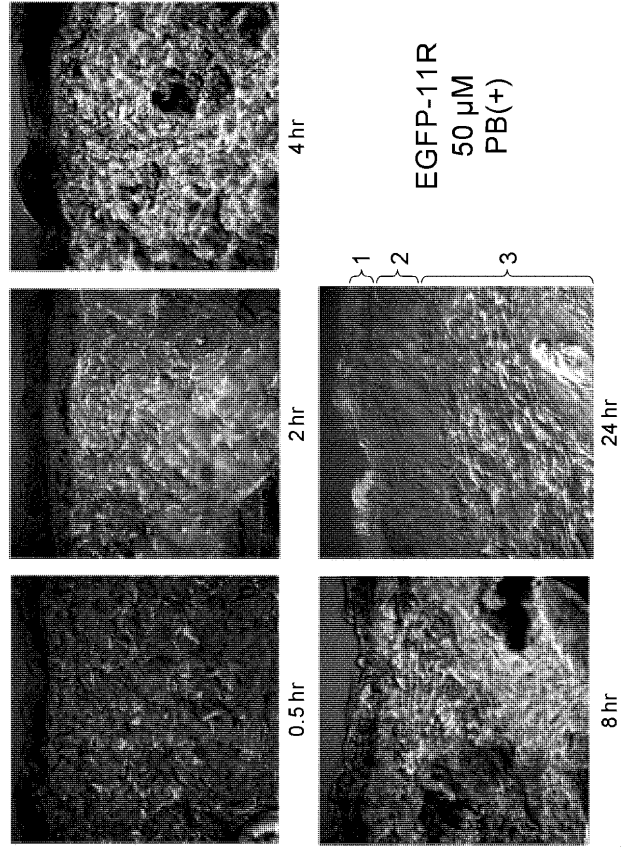
【 図 9 B 】



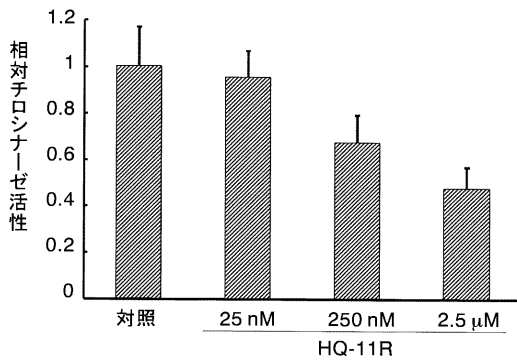
【 図 9 C 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【配列表】

2013031833000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年4月1日(2013.4.1)

【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】

アルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを薬物に付加したペプチド誘導体に、1-ピレン酪酸を組み合わせることを特徴とする皮膚導入システム。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

アルギニンの残基数が9～13である請求項1記載の皮膚導入システム。

【請求項4】

前記薬物が、タンパク質、ペプチド、低分子化合物から選択される請求項1または3記載の皮膚導入システム。

【請求項5】

前記タンパク質がEGFPである請求項4記載の皮膚導入システム。

【請求項6】

前記低分子化合物がハイドロキノンである請求項4記載の皮膚導入システム。

【請求項7】

ハイドロキノンにアルギニン3～13残基が連続したアミノ酸配列からなるペプチドを付加したハイドロキノンのペプチド誘導体を含む美白剤であって、1-ピレン酪酸との組み合わせを特徴とする美白剤。

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

医薬品、医薬部外品または化粧品に添加して用いられる請求項7記載の美白剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/071845
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K9/10(2006.01)i, A61K8/34(2006.01)i, A61K8/36(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61K31/05(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/12(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i, C07K14/61(2006.01)n 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) A61K9/10, A61K8/34, A61K8/36, A61K8/64, A61K31/05, A61K38/00, A61K47/12, A61K47/48, A61Q19/02, C07K14/61		
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 1996-2012 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) 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 A	JP 2003-507438 A (Cellgate, Inc.), 25 February 2003 (25.02.2003), claims 10, 11; paragraphs [0111], [0134] & WO 2001/013957 A2	1, 3-7, 9 2, 8
X A	Masayuki MATSUSHITA, "CloseUp Jikkenho 137 Tanpakushitsu Therapy-ho", Experimental Medicine, 2004, vol.22, no.18, pages 2655 to 2658	1, 3-7, 9 2, 8
P, X P, Y	Hiroyuki MICHIE, "Tanpakushitsu Donyuho ni yoru Shinki Hifu Donyu Yakuzai no Kaihatsu", San'yo Hosho Gakujutsu Bunka Zaidan Report, 01 October 2011 (01.10.2011), no.55, pages 25 to 29	1-5 6-9
<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 13 September, 2012 (13.09.12)		Date of mailing of the international search report 25 September, 2012 (25.09.12)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/071845

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2009/54361 A1 (Okayama University), 30 April 2009 (30.04.2009), entire text (Family: none)	1-9
A	JP 2009-23945 A (Okayama University), 05 February 2009 (05.02.2009), entire text (Family: none)	1-9
A	WO 03/72604 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 04 September 2003 (04.09.2003), entire text & US 2005/0096267 A1 & EP 1486507 A1 & WO 2003/072604 A1 & DE 60334194 D & AU 2003211322 A & CN 1639190 A	1-9
A	JP 2002-153288 A (Hideki MATSUI), 28 May 2002 (28.05.2002), entire text (Family: none)	1-9
A	JP 2002-502376 A (The Board of Trustees of the Leland Stanford, Junior University), 22 January 2002 (22.01.2002), entire text & US 6306993 B1 & GB 2341390 A & EP 975370 A & WO 1998/052614 A2 & DE 69818987 T & AU 7593898 A & PL 337033 A & BR 9809138 A & IL 132941 D & AT 251913 T & CA 2291074 A & ES 2210761 T & CN 1263473 A	1-9
A	JP 10-95738 A (Kabushiki Kaisha TTS Kagaku Gijutsu Kenkyusho), 14 April 1998 (14.04.1998), entire text (Family: none)	1-9
A	CA 2094658 A1 (Allelix Biopharmaceuticals Inc.), 24 October 1993 (24.10.1993), entire text (Family: none)	1-9

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 1 8 4 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K9/10(2006.01)i, A61K8/34(2006.01)i, A61K8/36(2006.01)i, A61K8/64(2006.01)i, A61K31/05(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K47/12(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i, C07K14/61(2006.01)n			
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. A61K9/10, A61K8/34, A61K8/36, A61K8/64, A61K31/05, A61K38/00, A61K47/12, A61K47/48, A61Q19/02, C07K14/61			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2012年 日本国実用新案登録公報 1996-2012年 日本国登録実用新案公報 1994-2012年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (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 A	JP 2003-507438 A (セルゲイト, インコーポレイテッド) 2003.02.25, 請求項10、11、【0111】、【0134】 & WO 2001/013957 A2	1,3-7,9 2,8	
X A	松下正之, CloseUp 実験法 137 タンパク質セラピー法, 実験医学, 2004, Vol. 22, No. 18, p. 2655-2658	1,3-7,9 2,8	
PX PY	道上宏之, タンパク質導入法による新規皮膚導入薬剤の開発, 山陽 放送学術文化財団レポート, 2011.10.01, No. 55, p. 25-29	1-5 6-9	
<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 13.09.2012		国際調査報告の発送日 25.09.2012	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 辰己 雅夫	4C 2941
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 1 8 4 5
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
A	WO 2009/54361 A1 (国立大学法人 岡山大学) 2009.04.30, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2009-23945 A (国立大学法人 岡山大学) 2009.02.05, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	WO 03/72604 A1 (科学技術振興事業団) 2003.09.04, 全文 & US 2005/0096267 A1 & EP 1486507 A1 & WO 2003/072604 A1 & DE 60334194 D & AU 2003211322 A & CN 1639190 A	1-9
A	JP 2002-153288 A (松井秀樹) 2002.05.28, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2002-502376 A (ザ ボード オブ トランスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバーシティ) 2002.01.22, 全文 & US 6306993 B1 & GB 2341390 A & EP 975370 A & WO 1998/052614 A2 & DE 69818987 T & AU 7593898 A & PL 337033 A & BR 9809138 A & IL 132941 D & AT 251913 T & CA 2291074 A & ES 2210761 T & CN 1263473 A	1-9
A	JP 10-95738 A (株式会社ティ・ティ・エス科学技術研究所) 1998.04.14, 全文 (ファミリーなし)	1-9
A	CA 2094658 A1 (Allelix Biopharmaceuticals Inc.) 1993.10.24, 全文 (ファミリーなし)	1-9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 Q	19/02	
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K	31/05	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K 8/36 (2006.01)	A 6 1 K	8/36	
C 0 7 K 14/61 (2006.01)	C 0 7 K	14/61	Z N A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, 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, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72) 発明者 道上 宏之

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72) 発明者 石川 早苗

岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB31 CC18 DD41N EE41N EE59 FF16 FF34 FF68
 4C083 AC231 AC232 AC471 AC472 AD411 AD412 CC03 DD39 EE16 FF04
 4C084 AA02 AA03 BA41 BA44 CA62 MA21 MA63 NA10 NA11 NA13
 NA14 ZA891
 4C206 AA01 AA02 CA19 MA03 MA05 MA11 MA43 MA83 NA10 NA11
 NA13 NA14 ZA89
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA16 BA50 CA40 DA20 EA15 FA34 FA74
 GA01 GA15 GA26

(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。