

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-511694

(P2012-511694A)

(43) 公表日 平成24年5月24日(2012.5.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Q 2GO45
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4BO63
<b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/15	Z
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Z
	GO 1 N 33/53	P

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2011-535509 (P2011-535509)	(71) 出願人	503327691
(86) (22) 出願日	平成21年11月5日 (2009.11.5)		株式会社アモーレパシフィック
(85) 翻訳文提出日	平成23年5月9日 (2011.5.9)		AMOREPACIFIC CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/KR2009/006480		大韓民国 ソウル特別市 龍山区 漢江路
(87) 国際公開番号	WO2010/056012		2街 181番地
(87) 国際公開日	平成22年5月20日 (2010.5.20)		181, Hangang-ro 2ga,
(31) 優先権主張番号	10-2008-0111838		Yongsan-gu, Seoul 14
(32) 優先日	平成20年11月11日 (2008.11.11)	(74) 代理人	100132230
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 佐々木 一也
		(74) 代理人	100082739
			弁理士 成瀬 勝夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法、及びこれを用いた皮膚改善物質のスクリーニング方法

(57) 【要約】

六淫外邪による皮膚変化を定量する方法及びこれを用いた皮膚改善物質のスクリーニング方法に関し、より詳しくは、皮膚細胞培養システムにおいて各外邪刺激による細胞変化を測定する方法であって、培養する皮膚細胞に六淫外邪の適切な刺激原によって刺激を与え、細胞変化程度を細胞生化学的方法で測定することによって、既存に提示された概念的な六淫外邪の影響を科学的で且つ定量的に表現できるようにした六淫外邪による皮膚変化を定量する方法及びこれを用いた皮膚改善物質のスクリーニング方法に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 風邪(風)、寒邪(寒)、暑邪(暑)、湿邪(湿)、燥邪(燥)、及び火邪(熱)からなる六淫外邪のうちから適切な皮膚刺激原を選定するステップと、

(b) 各刺激原による皮膚細胞の変化を測定することができる細胞生化学的方法を決定するステップと、

(c) 前記生化学的方法によって測定対象の皮膚の状態を測定するステップと、

(d) 各刺激原によって皮膚を刺激した後、刺激強度による細胞変化の程度を定量するステップと、

(e) 六淫外邪から皮膚を防御する漢薬材を皮膚に塗布した後、皮膚の状態を前記生化学的方法によって測定し定量するステップと、

を含むことを特徴とする六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

10

## 【請求項 2】

風邪の刺激原は、ホルムアルデヒドを含む大気汚染物質、ダニや花粉を含むアレルギー誘発物質、黄砂、LPS、PMA、及び炎症誘発サイトカインからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

## 【請求項 3】

寒邪の刺激原は、室温 35 ~ - 40 の低温であることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

## 【請求項 4】

暑邪の刺激原は、39 ~ 50 の高温であることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

20

## 【請求項 5】

湿邪の刺激原は、活性酸素種であることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

## 【請求項 6】

燥邪の刺激原は、水分含量 60%未満の乾燥空気であることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

## 【請求項 7】

火邪の刺激原は、紫外線 B、紫外線 A、可視光線、及び赤外線からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

30

## 【請求項 8】

前記細胞生化学的方法は、TNF-ELISA、PGE<sub>2</sub>ELISA、インターロイキン発現パターン分析、細胞増殖分析、FAS分析、RT-PCR、免疫細胞化学法、メラニン分析、カタラーゼ分析、DCFH-DA分析、DAPI染色法、-Gal染色法、MTT分析、LDH分析、遺伝子コメット分析、及び特定抗体を用いるウエスタンブロットからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

## 【請求項 9】

前記漢薬材は、白す(Angelica dahurica)、乾薑(Zingiberis officinale)、金銀花(Lonicera japonica)、黄か(Scutellaria baicalensis)、生地黄(Rehmannia glutinosa)、及び知母(Anemarrhena asphodeloides)からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法。

40

## 【請求項 10】

1) 候補物質が添加された細胞を風邪(風)、寒邪(寒)、暑邪(暑)、湿邪(湿)、燥邪(燥)、及び火邪(熱)からなる六淫外邪のうちから選ばれた少なくとも 1 種以上の刺激原によって刺激するステップと、

2) 前記 1) の刺激するステップの前後に、候補物質と共に陽性対照群として漢薬材で細胞を処理するステップと、

3) 皮膚の状態を細胞生化学的方法で測定して定量するステップと、

50

4) 候補物質の定量値と陽性対照群である漢薬材の定量値とを比較し、候補物質の効能を判断するステップと、  
を含むことを特徴とする皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 11】

風邪の刺激原は、ホルムアルデヒドを含む大気汚染物質、ダニや花粉を含むアレルギー誘発物質、黄砂、LPS、PMA、及び炎症誘発サイトカインからなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 12】

寒邪の刺激原は、室温 35 ~ -40 の低温であることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 13】

暑邪の刺激原は、39 ~ 50 の高温であることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 14】

湿邪の刺激原は、活性酸素種であることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 15】

燥邪の刺激原は、水分含量 60%未満の乾燥空気であることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 16】

火邪の刺激原は、紫外線 B、紫外線 A、可視光線、及び赤外線からなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 17】

前記細胞生化学的方法は、TNF-ELISA、PGE<sub>2</sub> ELISA、インターロイキン発現パターン分析、細胞増殖分析、FAS分析、RT-PCR、免疫細胞化学法、メラニン分析、カタラーゼ分析、DCFH-DA分析、DAPI染色法、-Gal染色法、MTT分析、LDH分析、遺伝子コメット分析、及び特定抗体を用いるウエスタンブロットからなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】

前記陽性対照群として使用する漢薬材は、白す (*Angelica dahurica*)、乾薑 (*Zingiberis officinale*)、金銀花 (*Lonicera japonica*)、黄芩 (*Scutellaria baicalensis*)、生地黃 (*Rehmannia glutinosa*)、及び知母 (*Anemarrhena asphodeloides*) からなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の皮膚改善物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】

前記皮膚改善物質は、六淫外邪による老化、色素沈着、皮膚乾燥、又は皮膚トラブルを改善する効果を有する物質であることを特徴とする請求項 10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の皮膚改善物質の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、六淫外邪 (six external evils) に起因する皮膚変化を定量する方法、及びこれを用いた皮膚改善物質のスクリーニング (screening) 方法に関し、より詳しくは、皮膚細胞培養システムにおいて各外邪刺激に起因する細胞変化を測定する方法であって、培養する皮膚細胞に六淫外邪の適切な刺激原によって刺激を与え、細胞変化程度を細胞生化学的方法で測定することによって、既存に提示された概念的な六淫外邪の影響を科学的且つ定量的に表現できるようにした六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法、及びこれを用いた皮膚改善物質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

六淫外邪は、漢医学において人体に悪い影響を与える外部要素、すなわち、病気の原因として弁別されており、風邪（風）、寒邪（寒）、暑邪（暑）、湿邪（湿）、燥邪（燥）、及び火邪（熱）といった外感病邪の通称である。風、寒、暑、湿、燥、及び火は、一般的に自然界の6種類の異なった気候変化であって六氣（ろっき）ともいうが、万物生長の条件として本来は人体に無害である。しかし、気候の変化が非正常的であり、六氣の発生が過剰であるか（太過）、又は、不足する（不及）ようになると、発病因子となって人体に侵入し疾病を引き起こすようになるが、このような六氣を六淫と呼んで、六邪ともいい、外感病、外邪ともいう。

【0003】

六淫は、主に顔や皮膚の部位の状態（condition）に変化を引き起こす。顔部位は、外部に常に露出していて、風、寒、及び暑等を含む外部条件の変化に耐えなければならない。皮膚は、人体の障壁としての役割をし、六淫の侵入から人体を保護するための最初の防壁としての働きをする。六淫が人体に侵入すると、皮膚の老化を引き起こし、特に厳しい寒さ、厳しい暑さ、乾燥、及び強い太陽光線等は、皮膚に非常に良くない結果をもたらす。皮膚の生理的老化現象は、必然的に我々の生きて行く環境中の六淫と切り離せない密接な関係を有している。六淫は、皮膚老化現象の外因として作用し、直接的に各種皮膚疾患や五官疾患を引き起こしたり病気を悪化させたりする。

10

【0004】

化粧品業界において、種々の漢方化粧品が開発されており、また、加えて、化粧品の製造時には多様な漢方理論が適用されている。しかしながら、漢方化粧品の製造のためにたとえ六淫概念が用いられたとしても、漢方化粧品の素材の効能が科学的に且つ客観的に証明されてはいないのが実情である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

これにより、本発明者らは、皮膚細胞培養システムを用いて六淫に該当する外部刺激とそれに伴う皮膚細胞変化を細胞生化学的技術で視覚化して定量化し、六淫外邪による皮膚損傷を防御することができる物質をスクリーニングする方法を開発し、本発明を完成するに至った。

【0006】

従って、本発明の目的は、六淫外邪による皮膚変化を科学的に表現できる皮膚細胞培養システムを構築し、これにより、六淫外邪による皮膚変化を定量する方法、及びこれを用いて皮膚改善物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0007】

前記目的を達成するために、本発明では

(a) 風邪（風）、寒邪（寒）、暑邪（暑）、湿邪（湿）、燥邪（燥）、及び火邪（熱）からなる六淫外邪のうちから適切な皮膚刺激原を選定するステップと、

(b) 各刺激原によって細胞変化を測定することができる細胞生化学的方法を決定するステップと、

40

(c) 前記生化学的方法によって測定対象の皮膚の状態を測定するステップと、

(d) 各刺激原によって皮膚を刺激した後、刺激強度による細胞変化の程度を定量するステップと、

(e) 六淫外邪から皮膚を防御する漢薬材を皮膚に塗布した後、皮膚の状態を前記生化学的方法によって測定し定量するステップと、  
を含む六淫外邪による皮膚変化を定量する方法を提供する。

【0008】

また、本発明では、前記皮膚変化を定量する方法を用いて皮膚改善物質をスクリーニングする方法を提供する。

【発明の効果】

50

## 【0009】

本発明に係る六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法は、皮膚細胞培養システムにおいて、六淫外邪に対応する刺激原を加えた後に細胞変化を科学的に、かつ、定量的に表現することができ、これは、該当する漢薬材の効能によって再確認することができる。

## 【0010】

従って、漢方化粧品 of 効能素材の発掘時に漢方効能を科学的結果によって客観的に表現し、製品の効能を増進させることができる。また、この方法は、化粧品のユーザの皮膚サンプルを得てユーザの皮膚状態の変化を測定する方法に、拡大適用することができるという長所がある。

## 【発明を実施するための形態】

10

## 【0011】

本発明は、

(a) 風邪(風)、寒邪(寒)、暑邪(暑)、湿邪(湿)、燥邪(燥)、及び火邪(熱)からなる六淫外邪のうちから適切な皮膚刺激原を選定するステップと、

(b) 各刺激原によって細胞変化を測定することができる細胞生化学的方法を決定するステップと、

(c) 前記生化学的方法によって測定対象の皮膚の状態を測定するステップと、

(d) 各刺激原によって皮膚を刺激した後、刺激強度による細胞変化の程度を定量するステップと、

(e) 六淫外邪から皮膚を防御する漢薬材を皮膚に塗布した後、皮膚の状態を前記生化学的方法によって測定し定量するステップと、

20

を含む、六淫外邪に起因する皮膚変化を定量する方法に関するものである。

## 【0012】

本明細書で使用する「六淫外邪」という用語は、皮膚に刺激を与えて皮膚老化を誘発する6種類の外部要素、すなわち、風邪(風)、寒邪(寒)、暑邪(暑)、湿邪(湿)、燥邪(燥)、及び火邪(熱)を意味する。

## 【0013】

また、本発明で使用する「六淫外邪に起因する皮膚変化」という用語は、六淫外邪への露出前の皮膚状態を基準とし、六淫外邪に露出した時点から変化した全般的な皮膚の変化を含むものであり、好ましくは、六淫外邪による皮膚損傷を意味するもので、例えば、皮膚老化、色素沈着、皮膚乾燥及び皮膚トラブル等をすべて含んでもよいが、これにのみ限定されるものではない。

30

## 【0014】

また、本発明で使用する「皮膚改善物質」とは、六淫外邪による老化、色素沈着、皮膚乾燥、又は皮膚トラブル等を改善する効果を有する物質を意味する。

## 【0015】

以下、本発明に係る六淫外邪による皮膚変化を定量する方法を段階別に詳しく説明する。

## 【0016】

まず、六淫外邪の適切な刺激原を選定する。本発明では、東医宝鑑等の漢医書概念に合うように六淫外邪の適切な刺激原として、風邪は炎症誘発要因、寒邪は低温刺激、暑邪は高温刺激、湿邪は活性酸素種(ROS: Reactive Oxygen Species)刺激、火邪は紫外線刺激等を選定した。これをより詳しく調べてみると、下記の通りである。

40

## 【0017】

## 1) 風邪

風邪に該当する刺激原は、皮膚に炎症を誘発し得る因子であって、ホルムアルデヒドのような大気汚染物質、ダニ及び花粉のようなアレルギー誘発物質、黄砂、LPS (bacterial lipopolysaccharide)、PMA (phorbol myristate acetate)、及び炎症誘発サイトカイン(cytokine)等が使用されてもよい。本発明では、前記炎症誘発因子を試験物質(又は、培養細胞)に対して0.0001~10重量%に使用してもよい。前記炎症誘発

50

因子の使用量が 0.0001 重量%未満の場合には、適切な強度の刺激を誘発できないという問題が発生し、10 重量%を超過する場合には、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまうという問題が発生する。

【0018】

このように風邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で良く知られている通常の方法を経て、TNF- 及び PGE<sub>2</sub> の生成量変化、又はこれを誘発する COX-2 タンパク質の生成量及び活性変化を測定することによって、皮膚変化量を測定することができる。また、炎症関連又は皮膚効能関連の生体指標を合理的に活用することもできる。

【0019】

2) 寒邪

寒邪に該当する刺激原は、皮膚に損傷を与えることができる寒さ刺激である。寒さ刺激は、皮膚の生体温度よりも低い温度に設定され、35 程度の室温から -40 の低温まで必要に応じて適用可能である。設定温度が低温 -40 よりも低い温度では、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまうという問題が発生し、35 よりも高い温度では、正常体温範囲内であるため寒邪刺激としての意味がない。このように寒邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で通常的に使用する細胞増殖率変化、細胞代謝変化、及びその他皮膚関連の生体指標を合理的に活用して皮膚変化量を測定することができる。

【0020】

3) 暑邪

暑邪に該当する刺激原は、皮膚に損傷を与えることができる暑さ刺激である。暑さ刺激は、皮膚の生体温度よりも高い温度に設定され、39 から 50 の高温まで必要に応じて適用可能である。設定温度が 39 よりも低い温度では、正常体温範囲内であるため暑邪刺激としての意味がなく、50 よりも高い温度では、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまうという問題が発生する。このように暑邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で通常的に使用する細胞損傷変化、細胞代謝変化、及びその他皮膚関連の生体指標を合理的に活用して皮膚変化量を測定することができる。

【0021】

4) 湿邪

本発明では湿邪の刺激原を選定するために、湿邪による皮膚損傷が主に梅雨時期の不純物や汚れ物が停滞して発生することと関連付け、湿邪が強くなった状況を、不純物や汚れ物が皮膚に停滞してエネルギー代謝副産物として生成される活性酸素種の量を増加させることと関連があると見て、湿邪に該当する刺激原として活性酸素種の刺激を選定した。活性酸素種の刺激は、直接的に活性酸素種を処理するだけでなく、活性酸素種を生体で誘発する物質や刺激処理まで含み、例えば、FeCl<sub>3</sub> 又は FeCl<sub>2</sub> のようにペントン反応 (fenton reaction) によってラジカルを誘導できる物質を含んでもよく、本発明の一実施例では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激を使用しているが、これにのみ限定されるものではない。

【0022】

前記 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激は、各 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 0.001 ~ 10 mM 範囲で適用することが好ましい。前記適用量が 0.001 mM 未満の場合には、刺激の強度が弱くて正常状態と比較することが難しいという問題が発生し、10 mM を超過する場合には、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまうという問題が発生する。

【0023】

このように湿邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で通常的に使用する細胞損傷変化、細胞抗酸化システム変化、及びその他皮膚関連の生体指標を合理的に活用して皮膚変化量を測定することができる。

【0024】

5) 燥邪

燥邪に該当する刺激原は、皮膚に損傷を与えることができる乾燥刺激である。乾燥刺激

10

20

30

40

50

は、直接的に乾燥空気に露出して処理するだけでなく、これと類似した反応を生体で誘発する物質や刺激処理まで含む。

【0025】

本発明で使用する乾燥空気は、水分含量60%未満の空気を意味し、水分含量35%の乾燥空気を刺激原として使用する場合、露出時間は5分～20分の間に限定することができる。このとき、露出時間が5分未満の場合には、乾燥刺激が微弱であり、20分を超過する場合には、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまう。しかし、具体的な実験条件（水分含量又は露出時間等）は、実験場所の室内湿度測定によって当業者が容易に調節可能である。

【0026】

このように燥邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で通常的に使用する細胞損傷変化、細胞増殖率変化、生体内カルシウム信号伝達システム変化、及びその他皮膚関連の生体指標を合理的に活用して皮膚変化量を測定することができる。

【0027】

6) 火邪

火邪に該当する刺激原は、皮膚に損傷を与えることができる太陽光線刺激が使用可能である。太陽光線刺激は、紫外線Bだけでなく、紫外線A、可視光線、及び赤外線刺激を含む。前記太陽光線刺激は、各太陽光線を5～200mJ/cm<sup>2</sup>の範囲で照射することが好ましい。前記照射量が5mJ/cm<sup>2</sup>未満の場合には、刺激の強度が弱くて正常状態と比較することが難しいという問題が発生し、200mJ/cm<sup>2</sup>を超過する場合には、刺激の強度が強すぎて細胞が全部死んでしまうという問題が発生する。

【0028】

このように燥邪を刺激原とする細胞反応による皮膚変化の定量方法は、当業界で通常的に使用する細胞損傷変化、生体防御システム変化、及びその他皮膚関連の生体指標を合理的に活用して皮膚変化量を測定することができる。

【0029】

これは、外感（外部刺激としての）六邪に該当するものであり、内感（内部現象としての）六邪の場合は、他のメカニズムと他の刺激として適用可能である。

【0030】

本発明に記載された六淫外邪は、それぞれ単独でも人体に侵入が可能であり、2種類以上の外邪が同時に侵入することもでき、それぞれ他のものに転換されるため、これを適切な生体指標と適切な代表的漢薬材を用いて適用することができる。例えば、風邪が侵入して熱邪に変わったり（「風熱」と指称する）、寒邪が湿邪として位置付けたり（「寒湿」と指称する）する場合がある。

【0031】

次に、各刺激原によって刺激原の強度及び適切な細胞生化学的方法を決定する。前記ステップにおいて、刺激原の種類によって特徴的に活用される細胞生化学方法を応用して行う。前記細胞変化反応が、前記六淫外邪、すなわち、風邪、寒邪、暑邪、湿邪、燥邪、及び火邪による変化を回復させる代表的な漢薬材と当該漢薬処方とによって、緩和又は抑制されることを確認することにより、その有意的な差を通じて風邪による皮膚老化を定量することができる。

【0032】

本発明で定量化のために経る細胞生化学方法は、当業界で良く知られている通常の方法を全部含んでもよい。例えば、風邪による皮膚変化の定量時にはTNF-ELISA、PGE<sub>2</sub>ELISA、又はインターロイキン発現パターン分析（Interleukin expression pattern analysis）等を、また、寒邪による皮膚変化の定量時には細胞増殖分析（Cell proliferation assay）又はFAS分析（FAS analysis）等を、更に、暑邪による皮膚変化の定量時にはRT-PCR又は免疫細胞化学法（immunocytochemistry）等を、更にまた、湿邪による皮膚変化の定量時にはメラニン分析（melanin analysis）、カタラーゼ分析（catalase assay）又はDCFH-D A分析（Dichlorofluorescein diacetate assay）等

10

20

30

40

50

を、そして、燥邪による皮膚変化の定量時には免疫細胞化学法を、また、火邪による皮膚変化の定量時にはD A P I染色法(D A P I staining)又は - G a l 染色法等を経ることができる。このような分析方法は、サイトカイン分析、抗酸化力分析、細胞毒性分析、細胞増殖分析、特定タンパク質、及び遺伝子変化パターン分析等を含むという点で、共通的特徴を有する。また、本発明では、細胞変化を測定できるM T T分析、L D H分析、遺伝子コメット分析(Comet assay)及び体を用いたウエスタンブロット(western blot)等を応用して、細胞生存率、細胞成長率、細胞膜損傷、D N A 損傷、及び特定タンパク質発現変化等を測定して皮膚変化を定量化することができる。

#### 【0033】

本発明で使用する細胞としては、人や動物の皮膚から主に分離され、また、培養できる角質形成細胞、繊維芽細胞、及び脂肪細胞等を含む、単一層培養技術(single-layer cultures)や三次元組織培養技術(3D tissue cultures)を利用できる全ての皮膚細胞株を活用することができる。また、大食細胞株のR A W 2 6 4 . 7 細胞のように皮膚内免疫を担当できる細胞株も使用可能であり、人の生検組織を活用することもできる。

10

#### 【0034】

最後に、六淫外邪を防御する代表漢薬材として、上位ステップで選定した方法の適合性を確認する。

#### 【0035】

このステップでは、六淫外邪それぞれの刺激原として選定され、測定指標として選定されたものが、漢薬材による効能を確認することができるか否かを測定することによって、対照群と実験群との有意的变化を測定することができる。

20

#### 【0036】

本発明で使用する漢薬材は、一般的に通用する漢薬材の薬性及び特徴を有するものだけでなく、東医宝鑑、傷寒論等の漢医学の古典の処方に従うか、又は漢医師が適切な漢方診断に従って処方したものを全て含んでもよい。より具体的に、例えば、白す(Angelica dahurica)、乾薑(Zingiberis officinale)、金銀花(Lonicera japonica)、黄か(Scutellaria baicalensis)、生地黄(Rehmannia glutinosa)、及び知母(Anemarrhena asphodeloides)等があるが、これにのみ限定されるものではない。

#### 【0037】

また、本発明は、前記六淫外邪による皮膚変化の定量方法を構築し、これを用いて皮膚改善物質をスクリーニングする方法に関するものである。

30

#### 【0038】

本発明に係る皮膚改善物質のスクリーニング方法は、下記のステップを含む。すなわち、

1) 候補物質が添加された細胞を風邪(風)、寒邪(寒)、暑邪(暑)、湿邪(湿)、燥邪(燥)、及び火邪(熱)からなる六淫外邪のうち1種以上の刺激原によって刺激するステップと、

2) 前記1)の刺激するステップの前後に、候補物質と共に陽性対照群として漢薬材をそれぞれ細胞に処理するステップと、

3) 皮膚の状態を細胞生化学的方法で測定して定量するステップと、

40

4) 候補物質の定量値と陽性対照群である漢薬材の定量値とを比較し、候補物質の効能を判断するステップ。

#### 【0039】

前記で使用する培養細胞、六淫外邪の刺激原、細胞生化学的方法、及び陽性対照群として使用した漢薬材は、上述した六淫外邪による皮膚変化を定量する方法で使用されたものと同様なものを使用することができる。

#### 【0040】

このような方法は、単一細胞培養システムだけでなく、人体皮膚まで拡大して適用することができる。

#### 【実施例】

50

## 【 0 0 4 1 】

以下、本発明を実施例及び試験例を参照してより具体的に説明するが、本発明はこれによって限定されるものではなく、当業界で通常的に周知された変形、置換及び挿入等が可能であり、これに関することも本願発明の範囲に含まれる。

## 【 0 0 4 2 】

## [ 参考例 1 ] 漢薬材抽出物の製造

白す (Angelica dahurica)、乾薑 (Zingiberis officinale)、金銀花 (Lonicera japonica)、黄芩 (Scutellaria baicalensis)、生地黄 (Rehmannia glutinosa)、及び知母 (Anemarrhena asphodeloides) 各 1 kg を 70% のエタノール 5 リットル (L) でそれぞれ 3 時間抽出した後、濾過して残余液を減圧濃縮し、各漢薬材の 70% エタノール抽出物を得た。この試料を用いて下記の実験を進行した。

10

## 【 0 0 4 3 】

## [ 実施例 1 ] 風邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株である HaCaT 細胞を 10% FBS - DMEM において、37、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。それぞれ細胞株を 5 × 10<sup>5</sup> cells/well で 6-well 細胞培養板に付着させ、1 μg/ml 濃度の LPS とするようにして風邪を誘発した。風邪を誘発した実験群に漢薬材として、「きよ 風解表 (expelling wind, relieving exterior syndromes)」、「きよ 風湿 (expelling wind-dampness)」の特性を有する白す (Angelica dahurica) 抽出物 (参考例 1) 10 μg/ml を同時に処理し、その効果を比較した。前記 LPS と白す抽出物を処理せずに培養した細胞株を対照群とし、この対照群を基準として変化した COX-2 (cyclooxygenase-2) タンパク質発現量とその活性で測定し、風邪による皮膚変化を定量した。

20

## 【 0 0 4 4 】

試験物質を処理した翌日、試料を採取して細胞粉砕液を 10% SDS - ゲル電気泳動によって展開し、ニトロセルロース膜 (nitrocellulose membrane) に移して 5% 無脂肪牛乳 (Non-fat milk) で反応を遮断 (blocking) した後、COX-2 単一抗体を用いてウエスタンブロットを行い、炎症反応に重要な役割をする COX-2 タンパク質の発現を濃度計 (densitometer) で比較した。その結果を下記表 1 に示す。

## 【 0 0 4 5 】

## 【表 1】

30

風邪刺激原として使用された LPS による COX-2 発現増加と白芷の効果

LPS処理	白芷抽出物処理	COX-2発現程度 (AU)	COX-2発現増加率 (%)
—	—	723	0.0
+	—	1571	117.3
+	+	1218	68.5

## 【 0 0 4 6 】

前記表 1 の結果において、白す抽出物は、LPS による炎症誘発を 40% 程度抑制する効果を示した。従って、LPS のような炎症誘発因子は風邪の刺激原として使用可能であり、また、COX-2 のようなタンパク質は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

40

## 【 0 0 4 7 】

## [ 実施例 2 ] 寒邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株である HaCaT 細胞を 10% FBS - DMEM において、37、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。それぞれ細胞株を 2 × 10<sup>5</sup> cells/well で 3.5-well 細胞培養皿に付着させ、-15 に置いて寒邪を誘発した。寒邪を誘発した実験群に漢薬材として「温中 きよ 寒 (expelling cold while maintaining warm)」の特性を有する乾薑 (Zingiberis officinale) 抽出物 (参考例 1) 10 μg/ml を同時に処理し、その

50

効果を比較した。低温処理なしに乾薑抽出物を処理せずに培養した細胞株を対照群とし、この対照群を基準として変化した細胞成長率を M M T 分析で測定し、寒邪による皮膚変化を定量した。

【 0 0 4 8 】

低温処理及び試験物質処理を行った翌日、培養中の細胞を 0 . 5  $\mu$ g/ml 濃度の M T T 試薬〔3-(4,5-ジメチル-2-チアゾール)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロマイド, Sigma〕で 2 時間処理した後に培養液を除去し、残留した紫色の沈殿物を D M S O 中に溶解し、560 nm で吸光度を測定した。その結果を下記表 2 に示す。

【 0 0 4 9 】

【表 2】

10

寒邪刺激原によって低温処理した後、成長減少と乾薑の効果

低温処理	乾薑抽出物処理	OD <sub>560</sub> (AU)	細胞成長率 (%)
—	—	0.9679	100.0
+	—	0.4825	49.9
+	+	0.7489	77.4

【 0 0 5 0 】

前記表 2 の結果において、乾薑抽出物は、低温処理による成長減少を効果的に取り戻すことができた。従って、低温処理は寒邪の刺激原として使用でき、また、細胞成長率は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

20

【 0 0 5 1 】

[ 実施例 3 ] 暑邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株である H a C a T 細胞を 10% F B S - D M E M において、37、5%-C O<sub>2</sub> の条件下で培養した。それぞれ細胞株を 2 × 10<sup>5</sup> cells/well で 3 . 5 -well 細胞培養皿に付着させ、-44 に置いて暑邪を誘発した。暑邪を誘発した実験群に「清熱解毒 (clearing heat and relieving toxicity)」の特性を有する漢薬材である金銀花 (Lonicera japonica) 抽出物 (参考例 1) 10  $\mu$ g/ml を同時に処理し、その効果を比較した。

30

【 0 0 5 2 】

暑邪による皮膚変化を定量した結果は、L D H 分析 (Sigma Aldrich, Product Number TOX-7) を活用して細胞膜安定性反応で測定した。高温処理及び物質処理を行った翌日、培養中の細胞培養液を集めて細胞残屑が完全に沈殿するように遠心分離 (12,000rpm、3 分) し、上澄液のみを取り出した。上澄液 100  $\mu$ l を 98 -well 実験板に入れて L D H 分析混合物 (LDH Assay Substrate : Cofactor : Dye solution = 1 : 1 : 1) を使用直前に作製し、200  $\mu$ l ずつ試料上澄液と混合した。光を遮断して 20 分間反応が進むように置いた後、1N- H C l 溶液をそれぞれ 25  $\mu$ l ずつ入れて反応を終了し、490 nm 及び 690 nm で吸光度を測定した。測定した 490 nm 吸光度から 690 nm 吸光度を引いて背景を除去し、測定吸光度値を補正した後、その結果を比較した。その結果を下記表 3 に示した。

40

【 0 0 5 3 】

【表 3】

暑邪刺激原で高温処理した後、細胞膜損傷増加と金銀花の効果

高温処理	金銀花抽出物処理	補正されたOD490 (AU)	細胞膜損傷率 (%)
—	—	0.1916	100.0
+	—	0.3577	186.7
+	+	0.3113	162.5

## 【0054】

10

前記表3の結果において、金銀花抽出物は、高温処理による細胞膜損傷を効果的に減らすことができた。従って、高温処理は暑邪の刺激原として使用可能であり、また、細胞膜損傷率は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

## 【0055】

[実施例4] 湿邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株であるHaCaT細胞を10%FBS-DMEMにおいて、37、5%-CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。それぞれ細胞株を1×10<sup>5</sup>cells/wellで98-well細胞培養板に付着させ、1mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理して湿邪を誘発した。湿邪を誘発した実験群に「清熱燥湿 (clearing heat and drying dampness)」の特性を有する漢薬材である黄か (Scutellaria baicalensis) 抽出物 (参考例1) 10 μg/mlを同時に処理し、その効果を比較した。

20

## 【0056】

湿邪による皮膚変化を定量した結果は、MTT分析を活用して細胞毒性程度で測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理及び物質処理を行った翌日、培養中の細胞を0.5 μg/ml濃度のMTT試薬〔3-(4,5-ジメチル-2-チアゾール)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロマイド, Sigma〕で2時間処理した後に、培養液を除去して残っている紫色の沈殿物をDMSOを用いて溶かした。その後、560nmで吸光度を測定し、その結果を下記表4に示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及び黄か抽出物を処理していない対照群を基準として細胞生存率を算出した。

## 【0057】

【表 4】

30

湿邪刺激原でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理した後、細胞毒性増加と黄芩の効果

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 処理	黄芩抽出物処理	OD <sub>560</sub> (AU)	細胞生存率 (%)
—	—	1.7679	100.0
+	—	0.7789	44.1
+	+	1.426	80.7

## 【0058】

40

前記表4の結果において、黄芩抽出物は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理による毒性増加を効果的に保護した。従って、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理は湿邪の刺激原として使用可能であり、また、細胞毒性は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

## 【0059】

[実施例5] 燥邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株であるHaCaT細胞を10%FBS-DMEMにおいて、37、5%-CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。それぞれ細胞株を2×10<sup>5</sup>cells/wellで48-well細胞培養板に付着させ、クリーンベンチ (clean bench) の中で培養板の蓋を開けて放置し燥邪を誘発した。燥邪を誘発するクリーンベンチ内の条件として温度29、湿度45%を基準とするが、実験条件に応じて変動を与えてもよい。乾燥条件に露出させながら「養陰生津 (nourishing Yin to produce body fluid)」の特性を有する漢薬材である生地黄

50

(*Rehmannia glutinosa*) 抽出物 (参考例 1) 10  $\mu\text{g/ml}$  を同時に処理し、その効果を比較した。

【0060】

燥邪による皮膚変化を定量した結果は、MTT 分析を活用して細胞毒性程度で測定した。乾燥露出処理及び物質処理を行った翌日、培養中の細胞を 0.5  $\mu\text{g/ml}$  濃度の MTT 試薬 [3-(4,5-ジメチル-2-チアゾール)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイド, Sigma] で 2 時間処理した後に、培養液を除去して残っている紫色の沈殿物を DMSO を用いて溶かした。その後、560 nm で吸光度を測定し、その結果を下記表 5 に示した。燥邪及び生地黄抽出物を処理していない対照群を基準として相対的な細胞生存率を算出した。

【0061】

10

【表 5】

燥邪刺激原で乾燥露出処理した後、細胞毒性増加と生地黄の効果

乾燥露出処理	生地黄処理	OD <sub>560</sub> (AU)	細胞生存率 (%)
—	—	1.463	100.0
+	—	0.6789	46.4
+	+	0.9127	62.4

【0062】

20

前記表 5 の結果において、生地黄抽出物は、乾燥露出処理による毒性増加を効果的に保護した。従って、乾燥露出処理は燥邪の刺激原として使用可能であり、また、細胞毒性は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

【0063】

[実施例 6] 火邪による皮膚変化の定量方法

人間の角質形成細胞株である HaCaT 細胞を 10% FBS-DMEM において、37、5%-CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。それぞれ細胞株を 5 × 10<sup>5</sup> cells/well で 6-well 細胞培養板に付着させ、UVB を照射して火邪を誘発した。火邪を誘発する UVB 条件として 40 mJ/cm<sup>2</sup> を基準とするが、実験条件に応じて変動を与えても良い。紫外線照射とともに「清熱瀉火 (clearing heat and purging fire)」の特性を有する漢薬材である知母 (*Anemarrhena asphodeloides*) 抽出物 (参考例 1) 10  $\mu\text{g/ml}$  を同時に処理し、その効果を比較した。

30

【0064】

火邪による皮膚変化を定量した結果は、遺伝子コメット分析を活用して DNA 損傷程度を測定した。紫外線照射処理及び物質処理を行った翌日、培養中の細胞を集めて細胞 20  $\mu\text{l}$  を溶かした L-Magarose 200  $\mu\text{l}$  に添加して、直ちに 75  $\mu\text{l}$  をコメットスライドに移した。その後、溶菌液 (lysis solution) と新しく用意したアルカリ溶液 (NaOH 0.6g/50 ml DIW) に順序に浸して処理し電気泳動した。SYBR グリーン I 希釈液 50  $\mu\text{l}$  を滴下して DNA を染色させた後、蛍光顕微鏡で 494 nm / 512 nm フィルタで観察し、写真を撮ってその程度を比較した。その結果を下記表 6 に示した。紫外線 B 照射及び知母抽出物を処理していない対照群を基準として相対的な DNA 損傷率を算出した。

40

【0065】

【表 6】

火邪刺激原で紫外線照射処理した後、細胞毒性増加と知母の効果

紫外線照射処理	知母抽出物処理	尾部長 ( $\mu\text{m}$ ) (tail length)	DNA損傷率 (%)
—	—	65.4	100.0
+	—	112.4	171.9
+	+	78.2	119.6

10

## 【0066】



前記表 6 の結果において、知母抽出物は、紫外線照射処理による DNA 損傷増加を効果的に保護した。従って、紫外線照射処理は火邪の刺激原として使用可能であり、また、DNA 損傷は細胞変化を測定する指標として活用可能であることが分かった。

## 【0067】

上述した実施例は、本発明の代表的な一例のみを示したもので、当業者によっていかなる他の形態にも変形が可能である。例えば、風邪の場合には、LPS の代わりにダニの破砕液で刺激を与えることもでき、また、寒邪、暑邪及び燥邪の場合には、各処理温度が固定されることなく、皮膚温度よりも低温、高温及び乾燥条件で幅広く活用が可能であり、更に、湿邪の場合にも、単純  $\text{H}_2\text{O}_2$  の他、ROS 生成を誘発する物質代用使用が可能であり、更にまた、火邪の場合にも、紫外線 A 又は赤外線等が刺激原として可能である。

20

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2009/006480</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12Q 1/16(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/16; A61K 36/605; A61K 36/75; A61K 36/8994; A61K 8/97; A61P 19/02; A61Q 19/02		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: Angelica dahurica, inflammation, skin		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2004-0037396 A (DONGKUGJEHYANG CO., LTD.) 07 May 2004 See the whole document, especially example 1	1,2,8-11,17-19
X	KR 10-0361592 B1 (HANBUL COSMETICS CO., LTD.) 22 November 2002 See the whole document, especially example 9	1,2,8-11,17-19
X	KR 10-2002-0089275 A (KIM, K. Y. et al.) 29 November 2002 See the whole document, especially page 4, 6, 7.	1,2,8-11,17-19
X	KR 10-2006-0008572 A (KWON, H. J.) 27 January 2006 See the whole document, especially page 4	1,2,8-11,17-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 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 03 AUGUST 2010 (03.08.2010)		Date of mailing of the international search report <b>04 AUGUST 2010 (04.08.2010)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, YUN-KYUNG Telephone No. 82-42-481-5605 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2009/006480****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the attached extra sheet.

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1, 8-10, 17-19(in part) and claims 2, 11

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2009/006480**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-2004-0037396 A	07.05.2004	None	
KR 10-0361592 B1	22.11.2002	None	
KR 10-2002-0089275 A	29.11.2002	KR 10-0504767 B1 KR 10-0527834 B1 KR 10-2003-0007243 A	29.07.2005 09.11.2005 23.01.2003
KR 10-2006-0008572 A	27.01.2006	None	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2009/006480**

continuation of Box No. III

The present invention can be divided into 6 groups based on their technical features.

Group 1: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 2, 11 directed to the method for quantifying and skin changes caused by wind stimulus and method of screening a skin condition-improving material against wind stimulus.

Group 2: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 3, 12 directed to the method for quantifying and skin changes caused by cold stimulus and method of screening a skin condition-improving material against cold stimulus.

Group 3: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 4, 13 directed to the method for quantifying and skin changes caused by heat stimulus and method of screening a skin condition-improving material against heat stimulus.

Group 4: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 5, 14 directed to the method for quantifying and skin changes caused by dampness stimulus and method of screening a skin condition-improving material against dampness stimulus.

Group 5: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 6, 15 directed to the method for quantifying and skin changes caused by dryness stimulus and method of screening a skin condition-improving material against dryness stimulus.

Group 6: Claims 1, 8-10, 17-19(in part) and claims 7, 16 directed to the method for quantifying and skin changes caused by fire stimulus and method of screening a skin condition-improving material against fire stimulus.

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, 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, 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100087343

弁理士 中村 智廣

(72)発明者 リー ジン ユング

大韓民国、138-220 ソウル特別市、ソンパ-グ、ジャムシル-ドング、トゥリジウム アパートメント 327-1404

(72)発明者 クワン スン サング

大韓民国、448-519 ギョンギ-ド、ヨンジン-シ、スジ-グ、サンヒヨン-ドング、サングウオン サンテビレ 3-チャ、228-1204

(72)発明者 ヨン ミョン ホン

大韓民国、448-755 ギョンギ-ド、ヨンジン-シ、スジ-グ、ジュジェオン 2-ドング、ビョクサン 1-ダンジ、104-1101

(72)発明者 キム ダク ヒ

大韓民国、137-030 ソウル特別市、セオチョ-グ、ジャムオン-ドング、ファミリー アパートメント、2-902

(72)発明者 キム ハン コン

大韓民国、443-793 ギョンギ-ド、スウォン-シ、ヨントン-グ、ミータン 3-ドング、ジュゴング グリーンビル アパートメント201-903

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB09 DA36 FB01 FB02 FB03

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ22 QR66 QR77 QS33 QX01

专利名称(译)	用于量化由六次感冒引起的皮肤变化的方法，以及使用该方法筛选皮肤改善物质的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012511694A</a>	公开(公告)日	2012-05-24
申请号	JP2011535509	申请日	2009-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社爱茉莉太平洋		
申请(专利权)人(译)	股票会社爱茉莉太平洋		
[标]发明人	リージンユング クワンスンサング ヨンミヨンホン キムダクヒ キムハンコン		
发明人	リー ジン ユング クワン スン サング ヨン ミヨン ホン キム ダク ヒ キム ハン コン		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 C12Q1/30 C12Q1/32 C12Q1/68 C12Q1/686 G01N33/5044 G01N2500/04		
FI分类号	G01N33/50.Q C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.P		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB09 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ22 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	佐佐木哉		
优先权	1020080111838 2008-11-11 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

更具体地，本发明涉及测量皮肤细胞培养系统中由外部诱发刺激引起的细胞变化的方法，其包括培养通过刺激皮肤细胞有适当的性暴力刺激和通过细胞生化方法测量细胞变化的程度，概念六护理邪恶的影响呈现给现有的科学本发明涉及一种定量评估由六次无法清除引起的皮肤变化的方法和使用该方法的皮肤改善物质的筛选方法。【选择图】无

LPS处理	白芷抽出物处理	COX-2発現程度(AU)	COX-2発現増加率(%)
-	-	723	0.0
+	-	1571	117.3
+	+	1218	68.5