

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-222185

(P2014-222185A)

(43) 公開日 平成26年11月27日(2014.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	2 G O 4 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-101719 (P2013-101719)  
 (22) 出願日 平成25年5月13日 (2013.5.13)

(71) 出願人 593196643  
 ワミレスコスメティックス株式会社  
 神奈川県横浜市港南区港南中央通7-16  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰  
 (74) 代理人 100101373  
 弁理士 竹内 茂雄  
 (74) 代理人 100118902  
 弁理士 山本 修  
 (74) 代理人 100135415  
 弁理士 中濱 明子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫蛍光染色を用いた効率的なスクリーニング法

(57) 【要約】

【課題】化粧品、医薬部外品の開発における、免疫蛍光染色を用いた効率的なスクリーニング試験方法を提供すること。

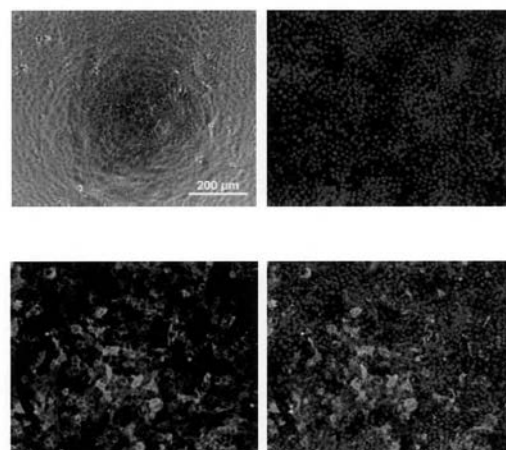
【解決手段】以下の(A)と(B)を組み合わせることを特徴とするスクリーニング試験方法：

(A) 多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニング

(B) 蛍光顕微鏡を用いる二次スクリーニング。

【選択図】 図2

植物エキス A 0.5%作用



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の (A) と (B) を組み合わせることを特徴とするスクリーニング試験方法：

(A) 多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニング

(B) 蛍光顕微鏡を用いる二次スクリーニング。

## 【請求項 2】

スクリーニング試験方法が、マイクロプレートの各ウェル内で細胞を培養し、固定・浸透化処理を行ってから、目的物質に対する抗体による免疫蛍光染色を行うことを含み、マイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニングが、各ウェルの蛍光強度の多点測定により細胞内の目的物質の量の増減を判定することを含み、請求項 1 の方法。

10

## 【請求項 3】

目的物質に対する免疫蛍光染色に加えて、核酸と結合して蛍光を発する色素による細胞核の染色を行い、マイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニングが、各ウェルの蛍光強度の多点測定により目的物質の量及び生細胞数の増減を判定することを含み、請求項 2 の方法。

## 【請求項 4】

二次スクリーニングが、一次スクリーニングの判定に基き選択されたウェルについて、蛍光顕微鏡により蛍光染色像を観察することを含み、請求項 2 または 3 の方法。

## 【請求項 5】

スクリーニング試験方法が、被験物質を含む培養液中あるいは含まない培養液中で細胞を培養することを含み、一次スクリーニングが、該試験物質を含まない培養を対照として数値化される細胞内の目的物質の量及び生細胞数の増減率をウェル毎に算出することを含み、一定の増減率を示したウェルについてのみ二次スクリーニングを行って、被験物質の有効性の有無を判断する、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 6】

スクリーニング試験が機能性化粧品の有効成分のスクリーニングのための試験である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

細胞がヒトケラチノサイト細胞であり、細胞内の目的物質がインボルクリンである、請求項 6 の方法。

30

## 【請求項 8】

細胞がヒトケラチノサイト細胞であり、細胞内の目的物質がトランズグルタミナーゼである、請求項 6 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、培養細胞を用いた被験物質の有効性スクリーニング試験に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

化粧品、医薬部外品の開発において、製剤や配合原料の安全性及び有効性評価のために、動物の培養細胞を利用した *in vitro* の検出・定量方法の開発が活発になっている。また、有用性試験項目の多様化に伴い、各種の評価法の確立が精力的に実施されている。

40

## 【0003】

例えば、機能性化粧品の素材として有望な素材をスクリーニングする際に、培養細胞の増殖や特定のタンパク質の発現の変化を判定し、有効性を評価するための指標とすることが行われている。

## 【0004】

具体的には、細胞を被験物質を含む培養液中で培養して当該物質を作用させた後、生存率の変化を観察したり、細胞内で産生された特定のタンパク質を検出・定量することで、

50

被験物質の有効性を判定する。

【0005】

細胞内の特定のタンパク質を検出する方法としては、当該タンパク質に特異的に結合する抗体を用いる方法が周知である。抗体（一次または二次）に酵素や色素を標識しておき、酵素との反応や光照射により生じるシグナル（発色、発光、蛍光）を検出することで、目的タンパク質の定量・定性解析が可能となる。

【0006】

ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫組織化学では、一般的に、標的分子に特異的な非標識抗体を最初のプローブ（一次抗体や結合タンパク）として使用し、シグナル検出を行うために、酵素や色素が標識された、一次抗体と結合する抗体を第二のプローブ（二次抗体）として使用する。

10

【0007】

シグナル検出のために蛍光標識を用いる方法は免疫蛍光法（蛍光抗体法）と呼ばれ、励起波長を当てて蛍光発色させることにより抗原抗体反応を可視化する。

特定のタンパク質の遺伝子発現を検出・測定するためには、RT-PCRを用いる方法が一般的である。

【0008】

一方、個々の細胞の形態や特定の物質（例えばタンパク質、核酸）の局在をin situで解析するためには、細胞の免疫蛍光染色画像の利用が有効である。この手法は、細胞を固定・浸透処理してから、検出対象物質に特異的な抗体を用いて抗原抗体反応を行い、結合した抗体を直接法（一次抗体が標識されている場合）、または蛍光標識された二次試薬を用いた間接法で検出する。染色の評価は、蛍光標識の励起波長を当てて蛍光発色させ蛍光顕微鏡で観察することにより行う。

20

【0009】

例えば、インボルクリンについての観察と定量は、Xiaoli Maら、Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, 50(6), 2416-2720等に記載の方法を用いて、免疫蛍光染色並びにRT-PCR及びウエスタンブロッティングを別々に行う。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Xiaoli Ma, Shigeto Shimmura, Hideyuki Miyashita, Satoru Yoshida, Miyuki Kubota, Tetsuya Kawakita, and Kazuo Tsubota ' Long-Term Culture and Growth Kinetics of Murine Corneal Epithelial Cells Expanded from Single Corneas ' Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, 50(6), 2416-2720

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

従来解析では、目的物質を蛍光染色して蛍光顕微鏡による観察後、観察画像とその画像を用いた画像解析、または他の試験（ELISAやウエスタンブロッティング）により目的物質の増減を解析する。しかし、有効成分のスクリーニング試験等では詳細な解析よりも、有効性の有無を素早く判断し、より多検体の解析が必要な場合がある。複数の試験や観察画像を細かく解析することは効率や費用の面から改善の必要があった。

40

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明らは上記課題を解決するため、1ウェルを多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を数値化し有効性を確認したものを、そのまま蛍光顕微鏡で観察する、効率的なスクリーニング試験方法を開発した。

【0013】

従って、本願により以下の発明を提供する。

(1) 以下の(A)と(B)を組み合わせることを特徴とするスクリーニング試験方法：

50

(A) 多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニング

(B) 蛍光顕微鏡を用いる二次スクリーニング。

(2) スクリーニング試験方法が、マイクロプレートの各ウェル内で細胞を培養し、固定・浸透化処理を行ってから、目的物質に対する抗体による免疫蛍光染色を行うことを含み、マイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニングが、各ウェルの蛍光強度の多点測定により細胞内の目的物質の量の増減を判定することを含む、(1)の方法。

(3) 目的物質に対する免疫蛍光染色に加えて、核酸と結合して蛍光を発する色素による細胞核の染色を行い、マイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニングが、各ウェルの蛍光強度の多点測定により目的物質の量及び生細胞数の増減を判定することを含む、(2)の方法。

(4) 二次スクリーニングが、一次スクリーニングの判定に基き選択されたウェルについて、蛍光顕微鏡により蛍光染色像を観察することを含む、(2)または(3)の方法。

(5) スクリーニング試験方法が、被験物質を含む培養液中あるいは含まない培養液中で細胞を培養することを含み、一次スクリーニングが、該被験物質を含まない培養を対照として数値化される細胞内の目的物質の量及び生細胞数の増減率をウェル毎に算出することを含み、一定の増減率を示したウェルについてのみ二次スクリーニングを行って、被験物質の有効性の有無を判断する、前記方法。

(6) スクリーニング試験が機能性化粧品の有効成分のスクリーニングのための試験である、前記方法。

(7) 細胞がヒトケラチノサイト細胞であり、細胞内の目的物質がインボルクリンである、(6)の方法。

(8) 細胞がヒトケラチノサイト細胞であり、細胞内の目的物質がトランズグルタミナーゼである、(6)の方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、同一の対象物をマイクロプレートリーダーと蛍光顕微鏡で解析することで、低コストかつ効率的に試験が可能である。また、蛍光顕微鏡による観察を併用できる事で、誤解析を防ぐことも可能な優れたスクリーニング方法である。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】 試料未作用の観察画像の例である。

【図2】 植物エキスAを0.5%作用させた観察画像の例である。

【図3】 植物エキスAを3%作用させた観察画像の例である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明のスクリーニング試験方法は、以下の装置(A)、(B)を組み合わせることを特徴とする：

(A) 多点測定可能なマイクロプレートリーダー

(B) 蛍光顕微鏡。

【0017】

本発明のスクリーニング試験方法では、マイクロプレートの各ウェル内で培養された細胞の蛍光染色強度及び画像の解析を、それぞれ上記装置(A)と(B)により実施する。

したがって、本発明は、マイクロプレートの各ウェル内で蛍光染色された細胞に対する、以下の(A)と(B)の二段階からなるスクリーニング試験方法を提供する：

(A) 多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いて蛍光染色強度の解析を行う一次スクリーニング

(B) 蛍光顕微鏡を用いて画像の解析を行う二次スクリーニング。

【0018】

「マイクロプレート」は、多数のウェルのついた平板からなる器具であり、生化学的分析や臨床検査などで用いられている。ウェルの数には6、12、24、96、384などがある。ウ

10

20

30

40

50

エルが多数のものを用いれば、同条件下で多数のデータを得ることができる。

【0019】

「マイクロプレートリーダー」は、マイクロプレートを用いて吸光・蛍光・発光を検出・測定するための機器であり、これによって微量かつ多数の試料の測定を同時に行うことができる。「多点測定」とは、ウェル内の複数のポイントを測定することをいう。本発明では、1ウェルを多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を数値化する。したがって、本発明で使用可能な機器としては、蛍光を測定可能なモードを有し、各ウェルについて9点以上、好ましくは12点以上の多点測定が可能なものであればよく、一般的に市販される機器がいずれも使用可能である。

【0020】

「蛍光顕微鏡」は、試料からの蛍光を観察することによって対象を観察する光学顕微鏡の一種であり、ほとんどの場合は、蛍光とは別に透過光の光路も確保され、同じ標本が透過光画像でも観察できるようになっている。2種類以上の蛍光物質を使う場合、それぞれのシグナルが別々に観察できる蛍光フィルターを用いる。蛍光顕微鏡は細胞生物学で汎用される機器であり、詳しい仕様の説明はメーカー各社のカタログやウェブサイト等で入手可能である。本発明では、使用する蛍光色素に応じた光学特性を持つフィルターを備えた一般的な蛍光顕微鏡が利用可能である。

【0021】

細胞の蛍光染色は、細胞内の目的物質を特異的に検出可能な蛍光試薬を用いて行う。例えば目的物質が細胞内の特定のタンパク質である場合、当該タンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、当業者に周知の一般的な方法により免疫蛍光染色を行う。典型的な手順としては、生細胞の細胞膜は抗体を通さないため、まず、固定・浸透化処理を行ってから、目的物質に対する抗体（一次抗体）を加える。次に、一次抗体を認識する抗体（二次抗体）を加える。二次抗体に付加されている蛍光により、目的物質の存在が可視化され、検出・測定・観察可能となる。マイクロプレートリーダーで各ウェルの蛍光強度の多点測定を行う事により、目的物質の量を解析することが可能となる。蛍光顕微鏡により蛍光染色画像を得ることができ、目的物質の局在が観察可能となる。

【0022】

また、本発明の一態様では、細胞内の目的タンパク質及び細胞核をそれぞれ特異的に検出可能な蛍光試薬を用いて二重染色を行う。タンパク質を特異的に検出可能な蛍光試薬の例は上述した一次抗体と二次抗体のセットである。細胞核を特異的に検出可能な蛍光試薬の例はHoechst33258、33342、2-diamidino-phenylindole (DAPI) のような核酸と結合して蛍光を発する色素である。核が発する蛍光に基き、培養細胞の数を解析することが可能となる。蛍光量と細胞数が比例関係である場合、マイクロプレートリーダーで測定される蛍光強度から細胞数を測定できる。また、蛍光顕微鏡により細胞核の数、形態、位置などの観察が可能となる。

【0023】

本発明のスクリーニング試験方法は、機能性化粧品の素材として有望な物質をスクリーニングすることに好適に使用できる。

具体的には、機能性化粧品の素材として有望な物質を「被験物質」として、培養細胞と接触させ、当該被験物質と培養細胞との相互作用が、細胞増殖、細胞形態、及び細胞内の特定の目的物質の産生に与える影響を解析し、被験物質の有効性の有無を判断する。

【0024】

好ましくは、本発明のスクリーニング試験方法では、被験物質を含む培養液中あるいは含まない培養液中で細胞を培養し、(A)多点測定可能なマイクロプレートリーダーを用いる一次スクリーニングにおいて、該試験物質を含まない培養を対照として数値化される細胞内の目的物質の量及び生細胞数の増減率をウェル毎に算出し、一定の増減率を示したウェルについてのみ、(B)蛍光顕微鏡を用いる二次スクリーニングを行って、被験物質の有効性の有無を判断する。

【0025】

10

20

30

40

50

細胞内の目的物質は、試験に使用する細胞内で産生され、化粧品の機能評価のための指標となる物質である。そのような物質の例としては、インボルクリンやトランスグルタミナーゼ等が挙げられる。

#### 【0026】

インボルクリンは、角層の周辺帯の形成に関わる前駆体タンパク質の一つであり、肌表皮のバリア機能に重要な役割を担っている。角層は、ケラチンや脂質等、様々な物質から構成され、生体を被覆し、水分の保持や侵入物に対する防御を行う。周辺帯は角質細胞の細胞膜を裏打ちする不溶性構造物であり、有棘層のケラチノサイト（有棘細胞）で作られるインボルクリンが、顆粒層で作られるロリクリンと架橋することで生じる。

トランスグルタミナーゼはCa濃度依存的に活性化するタンパク質架橋酵素である。トランスグルタミナーゼファミリーとしてはトランスグルタミナーゼ1~7とFactor XIIIの8種類のアイソザイムが確認されている。表皮では主に1と3が発現しており、細胞内の膜周辺領域でロリクリンやインボルクリンを架橋する事で不溶性の細胞膜裏打ち構造である周辺帯を形成している。

#### 【0027】

好ましくは、本発明のスクリーニング試験方法は、本明細書の実施例に記載された方法に類似する方法である。

具体的には、マイクロプレートに播種し、対数増殖期まで培養したヒトケラチノサイト細胞を、さらに被験物質を含む培養液中で72時間培養した後、マイクロプレート内で以下の二重染色を実施する。

- ・目的物質（インボルクリン）に対する抗体による免疫蛍光染色、および
- ・核酸と結合して蛍光を発する色素（Hoechst）で細胞核を染色。

#### 【0028】

次いで、一次スクリーニングとして、蛍光モードマイクロプレートリーダーにより各ウェルについて12点の蛍光強度を測定する。該試験物質を作用させない培養を対照（コントロール）として、インボルクリンの産生率をウェル毎に算出する。併せて、Hoechstの蛍光強度から生細胞率をウェル毎に算出する（対照のインボルクリン産生率と生細胞率はいずれも100%）。

#### 【0029】

一次スクリーニングで一定以上のインボルクリン産生率を示したウェルについて、産生が促進されている、すなわち被験物質の有効性が示されたと判定する。ケラチノサイトのインボルクリン産生を促進することにより、肌表皮のバリア機能を正常にする効果が期待できるからである。

#### 【0030】

二次スクリーニングとして、一定以上のインボルクリン産生促進率（例えば130%以上）を示したウェルについてのみ、測定に使用したプレートをそのまま蛍光顕微鏡により蛍光染色像を観察し、インボルクリンと核の蛍光画像を取得する。また、一定以上のインボルクリン産生促進率を示し、且つ生細胞率が明らかに減少（例えば80%以下）したウェルについて、インボルクリン産生促進という分化誘導による増殖抑制か細胞毒性によるものを観察し判断する。

#### 【0031】

次に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこの実施例に何ら限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0032】

#### インボルクリン産生促進におけるスクリーニング試験

ヒトケラチノサイト細胞を $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>の密度で96ウェルマイクロプレートに播種した。播種培地は10%ウシ胎児血清（FBS）を含むDMEM培地を使用して、CO<sub>2</sub>インキュベーター（5%CO<sub>2</sub>、37℃）内で24時間培養した。24時間後、各被験物質を添加した10%FBSを含むDMEM培地に置換し、72時間培養した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 3 】

PBS150  $\mu$ Lでリンスした後、4%パラホルムアルデヒド含有PBSで固定した。その後、浸透化処理を行い、抗原抗体反応によりインボルクリンを免疫蛍光染色した。一次抗体はマウス抗ヒトインボルクリン抗体 (Leica BIOSYSTEMS/Novocastra<sup>TM</sup> NCL-INV)、二次抗体はAlexaFluor488標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Invitrogen/MolecularProbes A-11001)を用いた。蛍光プレートリーダー (Perkin Elmer/Arvo-X3)により各wellについて12点の蛍光強度を測定した。試料未作用のコントロールを100%としてインボルクリン産生率を以下の式より算出した。また併せて、Hoechstで細胞核を染色し、生細胞数の比較も行った。生細胞率の算出も以下の式を用いた。

## 【 0 0 3 4 】

## 【 数 1 】

式 インボルクリン産生率、生細胞率 (%) = (B1-B0) / (A1-A0) × 100

A1 = 試料未添加の蛍光強度

A0 = 試料未添加で一次抗体未作用の蛍光強度

B1 = 試料添加の蛍光強度

B0 = 試料添加で一次抗体未作用の蛍光強度

## 【 0 0 3 5 】

上記試験結果にて一定以上のインボルクリン産生促進率 (例えば130%以上)を示したwellについて、測定に使用したプレートをそのまま蛍光顕微鏡 (Nikon/ECLIPSE Ti)により観察し、インボルクリン、核の蛍光画像を取得した。

## 【 0 0 3 6 】

その際に、生細胞率が明らかに減少 (例えば80%以下)したwellについて、インボルクリン産生促進という分化誘導による増殖抑制か細胞毒性によるものかを観察し判断した。分化誘導による増殖抑制の観察例としては、細胞は一様に広がっておりコンフルエント様を呈するものの細胞が肥大化しており細胞数 (核の数)が試料未処理と比較して少ない等が挙げられる。

## 【 0 0 3 7 】

図1~3の観察画像例の配置、及び、得られた結果 (数値化)を、以下の表に示す。

## 【 0 0 3 8 】

## 【 表 1 】

## 観察画像例

1	2
3	4

1: 明視野 -モノクロ画像

2: 蛍光 (青) -細胞

3: 蛍光 (緑) -インボルクリン

4: 蛍光 (青緑) -2細胞と3インボルクリンの merge

## 【 0 0 3 9 】

10

20

30

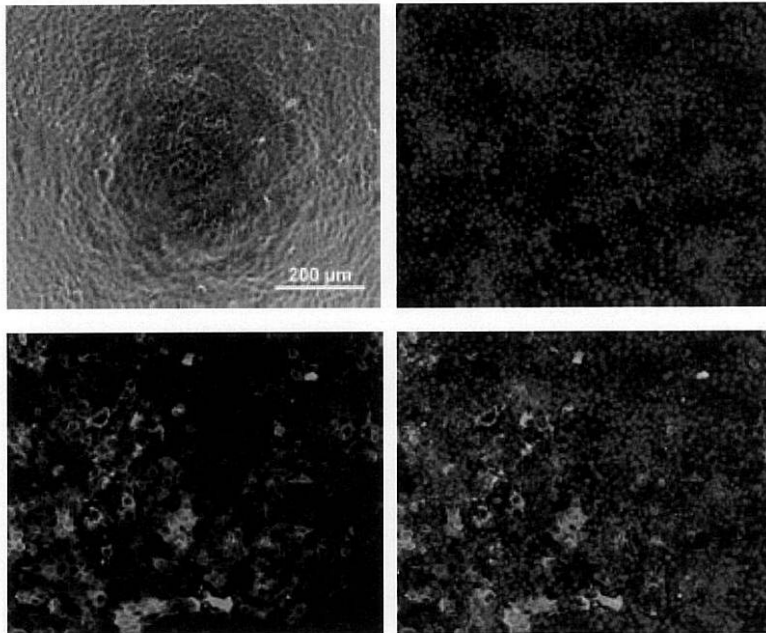
40

【表 2】

数値化		細胞	IVL
試料未作用		100.0%	100.0%
植物エキス A	0.5%	78.2%	130.4%
	3%	19.0%	194.1%

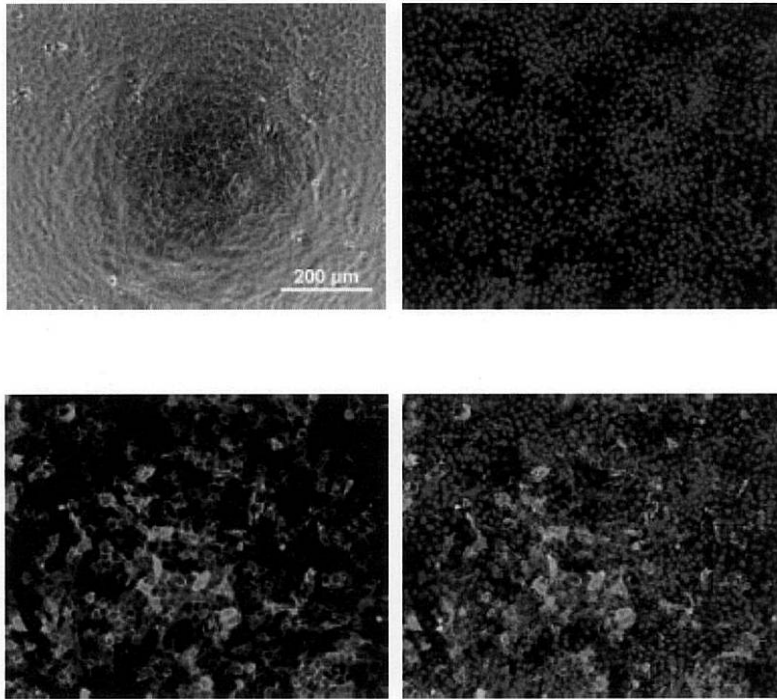
【図 1】

試料未作用



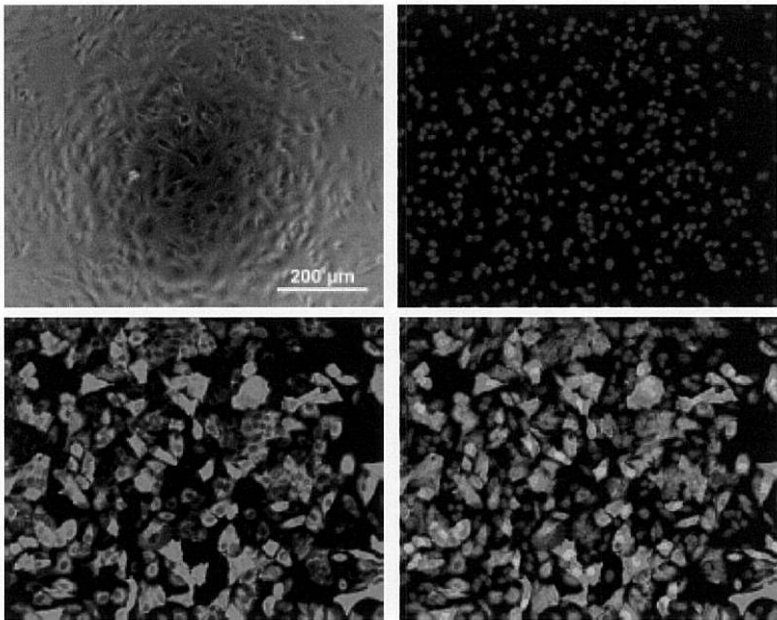
【図 2】

植物エキス A 0.5%作用



【図 3】

植物エキス A 3%作用



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 1 2 Q	1/52	(2006.01)	C 1 2 Q	1/52	

(72)発明者 瀬田 浩一  
神奈川県横浜市港南区港南中央通7 - 1 6 ワミレスコスメティックス株式会社内

(72)発明者 平田 直之  
神奈川県横浜市港南区港南中央通7 - 1 6 ワミレスコスメティックス株式会社内

(72)発明者 峯尾 貴也  
神奈川県横浜市港南区港南中央通7 - 1 6 ワミレスコスメティックス株式会社内

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 DA01 DA05 EA01 FA02  
2G045 AA25  
4B063 QA18 QQ08 QQ26 QQ79 QR06 QR48 QR77 QS33 QS39 QX02

专利名称(译)	使用免疫荧光染色的有效筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014222185A</a>	公开(公告)日	2014-11-27
申请号	JP2013101719	申请日	2013-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	WAMILES化妆品		
申请(专利权)人(译)	Wamiresu化妆品有限公司		
[标]发明人	瀬田浩一 平田直之 峯尾貴也		
发明人	瀬田 浩一 平田 直之 峯尾 貴也		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/573 G01N21/64 C12Q1/02 C12Q1/52		
FI分类号	G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/573.A G01N21/64.F C12Q1/02 C12Q1/52		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/DA05 2G043/EA01 2G043/FA02 2G045/AA25 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ79 4B063/QR06 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修 中滨 明子		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：在化妆品和准药物的开发中提供使用免疫荧光染色的有效筛选测试方法。 解决方案：一种筛选测试方法，其特征在于结合以下 (A) 和 (B)：(A) 使用能够进行多点测量的酶标仪进行初步筛选 (B) 使用荧光显微镜的二次筛选。 [选择图]图2