

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A ) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 329674

(P2003 - 329674A)

(43)公開日 平成15年11月19日(2003.11.19)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Q 2 G 0 4 5
A 6 1 B 5/00		A 6 1 B 5/00	M 4 C 0 3 8
	5/107	G 0 1 N 33/48	S
G 0 1 N 33/48		33/53	F
	33/53	33/88	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L ( 全 48数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2003 - 60238(P2003 - 60238)

(22)出願日 平成15年3月6日(2003.3.6)

(31)優先権主張番号 091813

(32)優先日 平成14年3月6日(2002.3.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 598039367

ジョンソン・アンド・ジョンソン・コンシューマー・カンパニ-ズ・インコーポレイテッド

JOHNSON & JOHNSON  
CONSUMER COMPANIES  
, INC .

アメリカ合衆国、08558 ニュ-ジャ-ージー州、スキルマン、グランドビュー・ロード (番地なし)

(74)代理人 100066474

弁理士 田澤 博昭 ( 外 1 名 )

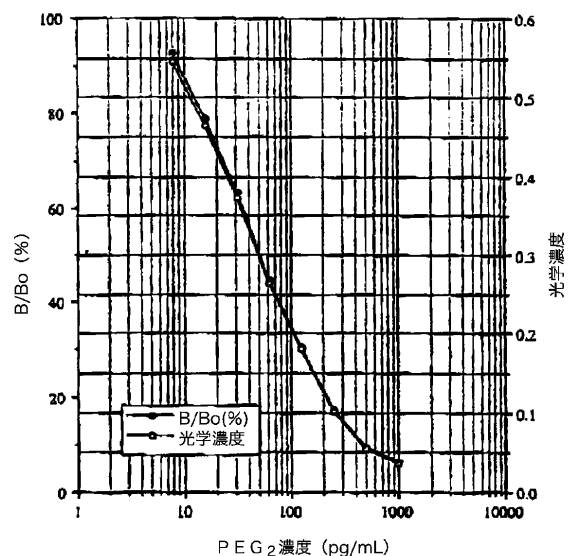
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 皮膚の炎症反応度又は刺激反応度の測定方法及びキット

(57)【要約】

【課題】 局部スキンケア製品を長期間にわたって消費者について試験する必要なく、これら製品の非顕性又は顕性の炎症反応度又は刺激反応度を測定する非侵襲的測定方法及びキットを提供する。

【解決手段】 哺乳動物の皮膚の局部スキンケア製品への暴露、外部からの攻撃又はこれらの組合せへの暴露による皮膚の非顕性又は顕性の炎症反応度又は刺激反応度を測定する非侵襲的生体内方法が開示される。一実施形態では、この方法は、非侵襲的収集器具を用いて皮膚からエイコサノイドを収集する段階と、皮膚から収集したエイコサノイドのレベルを分析する段階とを有する。皮膚刺激反応度又は炎症反応度のマーカを測定するキットも開示される。キットは、皮膚表面から分泌物を収集する収集器具と、分泌物中のエイコサノイドのレベルを測定する免疫学的検定器具とを有する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の皮膚の顕性又は非顕性炎症反応度又は刺激反応度のマーカを測定する方法であって、

(a) 非侵襲的収集手技を用いて皮膚の表面から分泌物を収集する段階を有し、前記非侵襲的収集手技は、非侵襲的収集器具を利用し、

(b) 前記器具により皮膚表面から収集された分泌物中の少なくとも1つのエイコサノイドのレベルを分析する段階を有していることを特徴とする方法。

【請求項2】 哺乳動物の皮膚の局部スキンケア製品、外部攻撃又はこれらの組合せに対する暴露に起因する哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性炎症反応度又は刺激反応度を測定する方法であって、

(a) 非侵襲的収集器具を含む非侵襲的収集手技を用いて前記皮膚の表面から分泌物を収集する段階と、

(b) 前記皮膚の表面から収集された分泌物中のエイコサノイドのベースラインレベルを測定する段階と、

(c) 前記皮膚を局部スキンケア製品、外部攻撃又はこれらの組み合わせに暴露させる段階と、

(d) 前記段階(c)の実施後、非侵襲的収集器具を用いて前記皮膚の表面から分泌物を収集する段階と、

(e) 前記段階(c)の実施後、前記皮膚の表面から収集された分泌物中のエイコサノイドのレベルを測定する段階と、

(f) 前記段階(e)で求めたエイコサノイドのレベルと前記段階(b)で求めたエイコサノイドのレベルを比較する段階とを有していることを特徴とする方法。

【請求項3】 哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性炎症反応度又は刺激反応度のマーカを測定するキットであって、

(a) 前記皮膚の表面から分泌物を収集する非侵襲的収集器具と、

(b) 前記分泌物中のエイコサノイドのレベルを測定する免疫測定法手段とから成ることを特徴とするキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】 関連出願の引照

本願は、2001年9月6日に出願された同時係属米国仮特許出願第60/317,638号明細書の権益主張出願である。

## 【0002】

【発明の属する技術分野】本発明は、皮膚の炎症反応度又は刺激反応度を測定する方法及びキットに関する。特に、本発明は、皮膚の炎症反応度又は刺激反応度を測定する非侵襲的生体内(in vivo)方法及びキットに関する。

## 【0003】

【従来の技術】皮膚は、身体のうち面積の最も広い器官であり、その外観は、人の自信及び生活の質(quality of life)に大きな影響を持っている。事実、或る人の最初の印象は長く続き、個人の外観(顔の特徴、髪の色

など)によって生じる場合が多い。

【0004】消費者は、自分の皮膚の状態(例えば、挫傷、乾癬、細いライン及び皺)を治療し、皮膚の健康状態(例えば、乾燥した皮膚、鮫肌状の皮膚、油っぽい皮膚)を改善し、又は、皮膚の斑点を覆うようスキンケア製品を用いている。種々の皮膚の治療の速度及び効能を向上させる新活性剤の開発に夥しいほど多大な研究が続けられており、これにより、極めて多量の新しいスキンケア配合物が作られている。これら製品は、特定のスキンケアに対して最終的な恩恵を与える場合が多いが、この恩恵を最大にするには長い期間(8週間~12週間以上)を要する。

【0005】これら局部スキンケア製品の最終的な恩恵は長期間にわたって送り出されるので、これら製品を長期間にわたって消費者について試験する必要なく、これら製品の刺激反応度プロフィールを決定する測定手段を開発することが望ましい。事実、目に見える副産物(即ち、非顕性効果)、例えば、炎症、刺激反応、浮腫及び紅斑が無い場合、1回使用後の刺激反応度プロフィールを決定できる高感度の測定法が非常に好ましい。加うるに、外部からの攻撃、例えば、擦過(アブレーション)、摩擦、擦れ、太陽光線への暴露、風への暴露、煙への暴露、他の環境条件への暴露又は粘着性器具、例えば、包帯の皮膚への脱着によっても、皮膚の損傷が生じる場合があり、これが原因となって炎症又は刺激反応を引き起こし、その程度は、測定法の影響を受けやすい。本発明は、かかる非顕性又は顕性効果を測定して定量化する新規な方法及び装置を提供する。

【0006】スキンケア製品への暴露又は外部からの攻撃に対する暴露により生じる皮膚の炎症反応は、皮膚内のケラチノサイトにより主として2つの別々の経路、即ち、サイトカイン経路とアラキドン酸経路を介して皮膚内のケラチノサイトによって調整がなされる。これら経路内においては、圧出され、分泌され、又は放出される種々のメディエータが、一次炎症メディエータ又は二次炎症メディエータであると考えられている。インターロイキン-1アルファ(IL-1)が、サイトカイン経路内における一次炎症前メディエータであると考えられ、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)が、アラキドン酸経路の一次炎症前メディエータであると考えられている。

【0007】刺激反応度又は炎症反応度の測定について存在するモデルには2つの大きな手法、即ち、試験管内(in vitro)測定法又は生体内(in vivo)測定法がある。非特許文献1は、現行の生体内皮膚コロージョン(corrosion)及び刺激反応度検査方法論の良好な概観を与えており、かかる非特許文献の記載内容全体を本明細書の一部を形成するものとしてここに引用する。代表的な皮膚コロージョン及び刺激反応度検査方法は、特許文献1に開示されており、この米国特許は、局部スキン

ケア製品の目又は皮膚の刺激反応度を測定する試験管内方法の利用を開示しており、かかる米国特許明細書の記載内容全体を本明細書の一部を形成するものとしてここに引用する。目又は皮膚の刺激反応度は、スキンケア製品の塗布後における模型細胞培養システムの成育可能性を測定することによって定量化される。この技術を用いて互いに異なるエンドマーカを測定することができ、これらは経時的にモニター可能である。別の方法が、特許文献2に開示されており、この欧州特許公開明細書は、細胞毒性及び炎症前終点を介して界面活性剤の刺激度を評価するようケラチノサイト及び線維芽細胞の人間の皮膚の同時培養から成る試験管内モデルを用いることを開示しており、かかる欧州特許公開明細書の開示内容全体を本明細書の一部を形成するものとしてここに引用する。これら方法は、潜在的な刺激反応度又は他の臨床的な安全上の問題に関する方向性のある情報を提供するが、試験管内モデルは、人の皮膚の示す炎症反応度及び刺激反応度を正確には表していない。

【0008】加うるに、スキンケア製品の臨床上の安全性を評価するために生体内方式も又用いられている。生体内方式の例としては、製品パッチテスト後の紅斑の評価を伴う4時間パッチ検査（これについては、非特許文献2を参照されたい）、24時間にわたるパッチ暴露後におけるIL-1及びエイコサノイドを測定するための吸引プリスタ流体の使用（これについては、非特許文献3を参照されたい）、急性皮膚刺激反応におけるエイコサノイド及びサイトカインレベルを測定するテープ剥離及びカプサイシンの使用（非特許文献4参照）が挙げられる。レインズ（Rheins）氏等の特許文献3（発明の名称：Method for Detection of Biological Factors in Epidermis）に教示された別の方法は、ユーザが皮膚を引っ掻き、又は粘着テープを用いて皮膚を剥がし、次に特定のポリヌクレオチド/サイトカインについて分析することを教示している。これらの方法は人のモデルを用いているが、手技中、誇張された使用条件又は高度の侵襲性が必要であり、それにより、臨床上の評価ツールとしてのこれらの有効性が制限される。これは、非顕性刺激反応度の評価の際に特に妥当する。

【0009】最近の数年間にわたり、ロビンソン氏等は炎症反応度のマーカとして炎症前サイトカインを吸収するSebutape（登録商標）（テキサス州ダラス所在のクダーム・コーポレーション（Cuderm Corporation）製）、即ち、接着剤塗布微孔質プラスチックフィルムを用いる非侵襲方法を開示している。1990年、この方法は、互いに異なる身体部位又は異なる年齢の個人についての刺激反応度の測定に適用できることが立証された（これについては、非特許文献5を参照されたい）。その後に行われた開発結果の示すところによれば、これら炎症マーカは、皮膚の条件と相関関係がある。この方法の適用の例としては、以下のものが挙げられ、即ち、インター

ロイキン-1レセプタアンタゴニスト（拮抗薬）（IL-1ra）とおむつかぶれのひどさとの相関関係（これについては、非特許文献6を参照されたい）、IL-1とラウリル硫酸ナトリウム（SLS）の塗布に起因する非顕性刺激反応度（目に見える紅斑は無い）の相関（これについては、非特許文献7を参照されたい）、炎症性頭皮状態の深刻さの評価（これについては、非特許文献8を参照されたい）が挙げられる。インターロイキン又は他のタンパク質を炎症反応度のマーカとして用いた場合に生じる潜在的な問題のうちの1つは、検査対象のスキンケア製品とのこれらの潜在的な相互作用である。例えば、これらタンパク質と或るスキンケア製品中に見受けられる陰イオン系界面活性剤との相互作用が原因となって、タンパク質が変性する場合があり、これは分析中にこれらの見掛けのレベルに影響を及ぼす場合がある。したがって、多種多様なスキンケア製品又は他の検査用化合物の存在下で安定性を保持する脂質（リピド）を主成分とするマーカの開発が好ましく、これは、タンパク質、例えばインターロイキンを炎症反応度/刺激反応度マーカとして用いる場合と関連のある上述の問題を解決する。加うるに、この方法は、皮膚に対する局部スキンケア製品の影響だけでなく、上述の外部攻撃への暴露の影響を測定できることが必要である。

【0010】

【特許文献1】米国特許第6,020,148号明細書

【特許文献2】欧州特許公開第0,497,39号明細書

【特許文献3】国際公開第00/10579号パンフレット

【非特許文献1】ロビンソン（Robinson）氏他著、「ストラテジーズ・フォア・ザ・アセスメント・オブ・アキユート・スキン・イリテーション・ポテンシャル（Strategies for the assessment of acute skin irritation potential）」、ジェイ・ファーマコル・トキシコル（J. Pharmacol. Toxicol.）、1999年

【非特許文献2】ロビンソン氏他著、「アプリケーション・オブ・ア・4-エイチ・ヒューマン・パッチ・テスト・メソッド・フォア・コンパラティブ・アンド・インベスティケーティブ・アセスメント・オブ・イリテーション（Application of a 4-h human patch test method for comparative and investigative assessment of skin irritation）」、コンタクト・ダーマティティス（Contact Dermatitis）、1998年

【非特許文献3】ミュラー-デッカー（Muller-Decker）氏他著、「アラキドニック・アシッド・メタボリズム・イン・プライマリ・イリタント・ダーマティティス・プロデュースド・バイ・パッチ・テストング・オブ・ヒューマン・スキン・ウィズ・サーファクタンツ（Arachidonic Acid Metabolism in Primary Irritant Dermatitis Produced by Patch Testing of Human Skin with

h Surfactants)」、トクシコロジー・アンド・アプライド・ファーマコロジー (Toxicology and Applied Pharmacology)、1998年

【非特許文献4】レイリィ (Reilly) 氏及びグリーン (Green) 氏著、「エイコサノイド・アンド・サイトカイン・レベルズ・イン・アキュート・スキン・イリテーション・イン・レスポンス・トゥ・テープ・ストリッピング・アンド・カプサイシン (Eicosanoid and Cytokine Levels in Acute Skin Irritation in Response to Tape Stripping and Capsaicin)」、アクタ・ダーム・ベネレオル (Acta. Derm. Venereol.)、1999年

【非特許文献5】パーキンス (Perkins) 氏他著、「デベロップメント・オブ・ア・ノンインベーシブ・メソッド・フォア・アセッシング・ヒューマン・スキン・イリテーション (Development of a noninvasive method for assessing human skin irritation)」、ミーティング・オブ・ザ・ソサイアティ・オブ・トクシコロジー (Meeting of the Society of Toxicology)、1997年

【非特許文献6】パーキンス氏他著、「ファーザー・デベロップメント・オブ・ア・ノンインベーシブ・メソッド・フォア・アセッシング・ヒューマン・スキン・イリテーション (Further Development of a noninvasive method for assessing human skin irritation)」、ソサイアティ・オブ・トクシコロジー・アニユアル・ミーティング (Society of Toxicology Annual Meeting)、1998年

【非特許文献7】パーキンス氏他著、「ノンインベーシブ・メソッド・フォア・アセッシング・インフラマトリイ・チェンジズ・イン・ケミカルリー・トリートド・ヒューマン・スキン (Noninvasive method for assessing inflammatory changes in chemically treated human skin)」、ソサイアティ・オブ・インベスティゲーティブ・ダーマトロジー・アニユアル・ミーティング (Society of Investigative Dermatology Annual Meeting)、1999年

【非特許文献8】カーディン (Cardin) 氏他著、「デベロップメント・オブ・ア・ノンインベーシブ・メソッド・フォア・リカバリー・オブ・モレキュラー・マーカーズ・オブ・ノーマル・アンド・コンプロミスド・スカalp・コンディショニング (Development of a noninvasive method for recovery of molecular markers of normal and compromised scalp conditions)」、ソサイアティ・オブ・トクシコロジー・アニユアル・ミーティング (Society of Toxicology Annual Meeting)、2001年

【0011】発明の概要

一実施形態において、本発明は、哺乳動物 (動物又は人間) の皮膚上に存在するエイコサノイド、好ましくは、プロスタグランジン、特に、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) を収集してその量を測定することにより

10

20

30

40

50

哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性の炎症反応度又は刺激反応度のマーカーを測定する方法に関する。本発明の方法は、(a) 非侵襲的収集手技を用いて皮膚の表面から分泌物を収集する段階を有し、上記非侵襲的収集手技は、非侵襲的収集器具を利用し、(b) 上記器具により皮膚表面から収集された分泌物中の少なくとも1つのエイコサノイドのレベルを分析する段階を有する。

【0012】エイコサノイドの測定は、非常にマイルドなスキンケア製品相互を識別し又は外部攻撃への暴露を識別するのに必要な感度をもたらし、他方、従来技術の方法と関連したタンパク質の変性に関する懸念を無くす。

【0013】本発明の別の実施形態は、哺乳動物の皮膚の局部スキンケア製品、外部攻撃又はこれらの組合せに対する暴露に起因する哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性炎症反応度又は刺激反応度を測定する方法であって、(a) 非侵襲的収集器具を含む非侵襲的収集手技を用いて上記皮膚の表面から分泌物を収集する段階と、(b) 上記皮膚の表面から収集された分泌物中のエイコサノイドのベースラインレベルを測定する段階と、(c) 上記皮膚を局部スキンケア製品、外部攻撃又はこれらの組み合わせに暴露させる段階と、(d) 上記段階(c)の実施後、非侵襲的収集器具を用いて上記皮膚の表面から分泌物を収集する段階と、(e) 上記段階(c)の実施後、上記皮膚の表面から収集された分泌物中のエイコサノイドのレベルを測定する段階と、(f) 上記段階(e)で求めたエイコサノイドのレベルと上記段階(b)で求めたエイコサノイドのレベルを比較する段階とを有していることを特徴とする方法を提供する。

【0014】好ましくは、エイコサノイドは、プロスタグランジン、より好ましくはプロスタグランジン E<sub>2</sub> である。好ましくは、上記段階(d)は、上記段階(c)の実施後約24時間の時点で実施される。

【0015】上記非侵襲的収集器具は、非被覆非孔質プラスチックフィルム、非被覆微孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した非孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルム、繊維状ウェブの織布、繊維状ウェブの不織布、天然スポンジ、合成スポンジ及びプラスチックフォームから成る群から選択された器具であるのがよい。

【0016】別の実施形態では、本発明の方法は、器具によって皮膚表面から収集された分泌物中の少なくとも1つのサイトカインのレベルを分析する段階を更に有する。好ましくは、上記サイトカインは、インターロイキン-1 である。最も好ましくは、上記サイトカインは、インターロイキン-1 であり、上記エイコサノイドは、プロスタグランジン E<sub>2</sub> である。

【0017】さらに別の実施形態では、本発明の方法は、皮膚の分泌物中のタンパク質のレベルを測定し、エイコサノイドのレベルをタンパク質のレベルに対して標

準化する段階を更に有している。

【0018】本発明の別の特徴は、哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性炎症反応度又は刺激反応度のマーカを測定するキットであって、(a)上記皮膚の表面から分泌物を収集する非侵襲的収集器具と、(b)上記分泌物中のエイコサノイドのレベルを測定する免疫測定法手段とから成ることを特徴とするキットを提供する。

【0019】

【発明の実施の形態】皮膚上に圧出され又は分泌された特定のマーカ、例えば、サイトカイン(インターロイキン-1を含む)又はエイコサノイド(PGE<sub>2</sub>によって例示されるプロスタグランジンを含む)のレベルを用いて局部スキンケア製品、外部攻撃に対する皮膚の暴露、又はこれらの組合せにより皮膚上に誘発された非顕性又は顕性の皮膚刺激反応度又は炎症反応度を定量化することができる。加うるに、マーカ、例えば、エイコサノイドとサイトカインの組合せの測定を利用すると、非顕性又は顕性の皮膚刺激反応度又は炎症反応度の量についてのより完全な情報が得られる。

【0020】本明細書で用いる「局部スキンケア製品」という用語は、個人用化粧品、洗面用化粧品、健康管理製品、例えば、乾式又は湿式拭き取り紙、洗浄剤、入浴液、シャンプー、ゲル、石鹸、スティック、バーム、におい袋、枕、ムース、スプレー、ローション、クリーム、洗浄用配合物、パウダ、オイル、デオドラント、バスオイル及びバスに添加可能な他のバス配合物を意味している。また、局部スキンケア製品としては、エーロゾル、蠟燭、気化器に用いることができる物質が挙げられるが、これらには限定されない。上述の局部スキンケア製品は、当業者には周知である。

【0021】本明細書で用いる「外部攻撃」という用語は、皮膚に刺激反応又は炎症を引き起こす場合のある個人用ケア製品以外の刺激を意味している。外部攻撃の例示としては、擦過(アブレーション)、摩擦、スクラビング、太陽光線への暴露、風への暴露、煙への暴露、他の環境条件への暴露又は粘着性器具、例えば、包帯の皮膚への脱着が挙げられる。

【0022】本明細書で用いる「非侵襲的収集手技」という用語は、収集中、目に見える紅斑を生じさせない皮膚表面からの分泌物の収集手技を意味している。

【0023】本明細書で用いる「非侵襲的収集器具」という用語は、収集中、目に見える紅斑を生じさせない皮膚表面からの分泌物の収集器具を意味している。

【0024】本発明の方法は、局部スキンケア製品による処置、外部攻撃への暴露又はこれらの組合せに回答して皮膚の刺激反応度を測定する。局部スキンケア製品を多種多様な器具を用いて皮膚に塗布するのがよく、かかる器具としては、パッチ、球状の綿、拭き取り紙、チャンバ(chambers)が挙げられるが、これらには限定されない。皮膚を局部スキンケア製品に当てるのに用いるこ

とができる閉塞パッチの一例は、Hill Top chamber(登録商標)(オハイオ州シンシナティ所在のヒル・トップ・リサーチ社製)である。このパッチは、成形プラスチックチャンバを有し、この中で、不織Webriil(登録商標)パッド(サウスカロライナ州シンプソンビル所在のビービーエー・ノンウブズ社製)が局部スキンケア製品を保持している。チャンバを、半閉塞軽度アレルギー性粘着テープを用いて皮膚に貼付される。局部スキンケア製品を種々の期間にわたり、例えば、1分~24時間の範囲で皮膚に塗布するのがよい。外部攻撃に対する暴露の例としては、タオル、拭き取り紙、パフ、浴用品によるスクラビング、太陽、煙、風又は他の環境要因に対する皮膚の暴露、又は衣服の着用に起因する摩擦が挙げられるが、これらには限定されない。外部攻撃の暴露時間は例えば、1分~1年間の範囲にわたる場合があり、場合によっては、暴露の寿命を含む場合がある。

【0025】局部スキンケア製品又は外部攻撃に対する皮膚の暴露に続き、非侵襲的収集器具を用いて皮膚表面上に存在している皮膚分泌物に含まれた炎症性メディエータを吸収又は収集する。メディエータを皮膚から吸収又は収集する適当な非侵襲的器具の一例は、軽度の接着剤が塗布された微孔質プラスチックフィルム、例えば、Sebutape(登録商標)(テキサス州ダラス所在のクダーム・コーポレーション製)である。炎症性メディエータの収集は、局部スキンケア製品又は外部攻撃に対する暴露後、様々な時点で行うのがよく、これは、暴露直後から暴露後24時間以上にわたる。例えば、炎症性メディエータを局部スキンケア製品又は外部攻撃に対する皮膚の暴露後1時間、3時間又は24時間の時点で収集するのがよい。本発明者は、PGE<sub>2</sub>圧出の動力学的挙動の研究において、PGE<sub>2</sub>のレベルが暴露後、短い時間に対し24時間の時点が最も高いことを発見した。しかしながら、累積的效果の場合、暴露の寿命全体を通じて時間の関数として測定を行うことが適している場合がある。

【0026】他の適当な非侵襲的収集器具としては、非被覆非孔質プラスチックフィルム、非被覆微孔質プラスチックフィルム、接着剤被覆非孔質プラスチックフィルム、接着剤被覆微孔質プラスチックフィルム、繊維状ウェブ織布、繊維状ウェブ不織布、天然スポンジ、合成スポンジ及びプラスチックフォームが挙げられる。

【0027】非侵襲的収集器具による収集に続き、多種多様な分析技術のうち1以上を用いて炎症性メディエータのレベルを分析する。本発明の実施に有用な例示の分析法としては、免疫測定法及び器械的分析法が挙げられるが、これらには限定されない。

【0028】本発明の実施に有用な例示の免疫測定法としては、例えば、放射免疫測定法(ラジオイムノアッセイ)(RIA)、蛍光免疫測定法(FIA)、酵素免疫測定法(EIA)及び酵素結合イムノソルベント検定法

(ELISA)のような免疫測定法が挙げられる。免疫測定法は、抗体抗原反応を利用して分泌物を同定して定量化するのに役立つ。免疫測定法で用いられる抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体の何れかであるのがよい。「サンドイッチ」免疫測定法として知られている一手法では、測定されるべき分析物に対する抗体を個体表面、例えば、ビーズ又はプラスチック(微小滴定濃度)プレート上に不動化する。測定されるべき分析物を含む試験サンプルを抗体ビーズと混合し、又はプラスチックプレート内に配置し、その結果、抗体と分析物の錯体が生じる。次に、指示薬を担持し又はこれと共役関係をなす別の抗体で構成された指示試薬を混合物に添加する。指示薬は、RIAについては放射性同位元素(ラジオアイソトープ)、EIA又はELISAについては酵素、FIAについては蛍光体であるのがよい。EIA又はELISAで最も一般的に用いられている酵素は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼである。抗体と指示薬の共役物は、第一抗体-分析物錯体に結合し、自由抗体-指示薬共役物は、洗い流され、抗体-分析物-抗体-指示薬錯体は、指示試薬と適合性のある方法を用いて定量化される。例えば、酵素免疫測定法の場合、定量化は、酵素と反応する物質を添加することによって行われる。

【0029】競合結合免疫測定法と呼ばれている別の手法では、測定されるべきサンプル中の分析物が、不動化抗体に結合する指示薬(分析物-指示薬共役物)で標識付けされた既知の量の追加分析物と競合する。反応後、自由分析物-分析物-指示薬溶液を固体相から洗い流す。次に、固体相に付着し又は洗浄溶液中に残っている分析物-指示薬を用いて、分析物-指示薬だけを用いた対照測定法に対して測定されたサンプル中に存在する分析物の量を定量化する。これは、測定法に適した方法、例えば、酵素活性度、蛍光、放射能等を用いて行われる。

【0030】置換法として知られている別の手法では、競合反応ではなく置換反応を用い、この場合、分析物が抗体に結合された分析物-指示薬に置き換わる。

【0031】共役は、抗体又は抗原と別の分子、例えば、放射性同位元素、酵素、例えばペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ又はグルコースオキシダーゼ、又は、蛍光体、例えば、蛍光剤又はローダミンBとの化学結合を含む。また、抗原及び抗体を共役させる非共有結合法を用いてもよい。例えば、一手法では、抗原及び(又は)抗体をビオチン又はストレパビジンの何れかを用いて標識付けし、次に、共役物を競合タイプ又は置換タイプの免疫測定法で用いるのがよい。かかる共役物を用いた場合の利点は、アビジン-ビオチン錯体のアフィニティ定数が非常に高いこと、約 $10^{14}$ L/モルに見積もられるということにある。

【0032】従来、EIAは、多数の窪みの付いたプレ

ート、例えば96個の窪み付きの微小滴定濃度プレートを備えた状態で開発され、これらプレートは、アッセイ(測定装置)、反応容器の不動化支持体となり、又、分光光度計を利用した読取り装置に結合されると、或る物質と抗体-抗原-酵素錯体との相互作用に起因して生じる色を検出して定量化する迅速手段となる。

【0033】基本的なEIAには多くの変形例がある。例えば、EIAは、免疫測定法の速度及び感度を上げるために酵素の増幅を利用する場合がある。この手法では、EIA中の酵素標識は、多量の色を非常に短時間で生じさせることができる別の酵素利用システムをトリガする物質を生じさせる。かくして、抗原-抗体-酵素錯体の酵素力の生成物を直接検出する必要はなく、むしろ、これは第2の反応を開始させる触媒として働くことができる。第2の酵素系は、比較的多量に存在して迅速な色の生成を容易にするのがよい。というのは、第2の酵素は、不活性であって、第1の反応生成物がこれを見えるようにするまで測定法と相互作用しないからである。

【0034】補欠分子族標識免疫測定法(PGLIA)と呼ばれている酵素活性化に対する別の手法により、EIAを洗浄段階が不要な均質フォーマットで行うことができる。この手法の利点は、かかるアッセイについて分離段階が不要であるということにある。

【0035】本発明の方法の実施においてPGE<sub>2</sub>のレベルを定量化するのに用いることができる例示の免疫測定法は、ミシガン州アンアーバー所在のアッセイ・デザインズ・インコーポレイテッドから入手できる高感度PGE<sub>2</sub>酵素免疫測定装置ナンバー93001である。

【0036】本発明の実施に有用な例示の器具を用いた分析法としては、ガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)等並びに比色定量法又は分光法が挙げられる。本発明の実施に有用な例示の比色定量法は、バイシンコニン酸(BCA)を用いる全タンパク質アッセイである(イリノイ州ロックフォード所在のピアス・ケミカル・カンパニー製のキットナンバー23225)。

【0037】実験例

本発明の利点及び本発明の方法及びキットの特定の実施形態は、以下の実験例によって説明される。しかしながら、本発明は、個々の実験例に記載された特定の限定事項には制限されず、特許請求の範囲に記載された本発明の範囲内で定められることは理解されよう。

【0038】以下に説明する実験例においては、PGE<sub>2</sub>、IL-1及びタンパク質のレベルをそれぞれ、アッセイ・デザインズ・インコーポレイテッドの免疫測定キットナンバー93001、エンドゲン・インコーポレイテッドの免疫測定キットEH2-IL1A及びピアス社製のBCAタンパク質アッセイ試薬キットを用いて求

めた。これらアッセイの概要を以下に記載する。

【0039】アッセイ・デザインズ・インコーポレイテッドのPGE<sub>2</sub>酵素免疫測定法

分析は、調達したGoat anti-Mouse IgG 96 - 窪み微小滴定濃度プレートで行われる。

【0040】一連の8つのPGE<sub>2</sub>標準溶液を50, 000 pg/mL PGE<sub>2</sub>を含む標準液の階段希釈によって調製する。8つの標準液は、それぞれ、1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81 pg/mL PGE<sub>2</sub>を含む。

【0041】100 μLのアッセイ緩衝剤をピペットで非特異性結合(NSB)及びB<sub>0</sub>(0 pg/mL)窪み内に移す。

【0042】PGE<sub>2</sub>標準溶液の各々をピペットで100 μL適当な窪み内に移す。

【0043】サンプルの各々をピペットで100 μL適当な窪み内に移す。

【0044】50 μLのアッセイ緩衝剤をピペットでNSB窪み内に移す。

【0045】50 μLの青色共役物(PGE<sub>2</sub>と共役関係をなすアルカリ性ホスファターゼの青色溶液)をピペットで完全活動状態(TA)及び空の窪みを除き、各窪み内に移す。

【0046】50 μLの黄色の抗体(PGE<sub>2</sub>に対するモノクローナル抗体の黄色溶液)をピペットで空の窪み、TA窪み及びNSB窪みを除き、各窪み内に移す。

【0047】提供されたプレートシーラで覆われたプレートを4で一晩(18時間~24時間)培養する。

【0048】窪みを空にし、200 μLの洗浄用液を窪みに追加して洗浄する。洗浄を全部で3つの洗浄について2回以上繰り返す。最後の洗浄後、窪みを空にし、プレートをしっかりとリントの無い紙タオル上で叩いて残存する洗浄緩衝剤を除去する。

【0049】5 μLの青色共役物をTA窪み内に追加する。

【0050】200 μLのp-NPP(p-ニトロフェニルホスフェート)基質溶液を各窪みに追加する。

【0051】プレートを覆い、振盪しないで37で1時間かけて培養する。

【0052】50 μLの停止液(リン酸三ナトリウム)を各窪みに追加する。プレートを停止液の追加直後に読み取る。

【0053】プレートを空の窪みに対しプレート読取り装置でくるむ。窪みの最適密度を405 nm、好ましくは570 nm~590 nmの補正值で読み取る。

【0054】サンプル中のPGE<sub>2</sub>の濃度の計算を、4パラメータロジスティック(算定)曲線当てはめプログラム、例えば、バイオソフト社(ミズーリ州ファーガソン所在)によって市販されている“AssayZap”を用いる免疫測定ソフトウェアパッケージによって行うのが好ま

しい。変形例として、PGE<sub>2</sub>の濃度を以下のようにして計算してもよい。

【0055】各標準液及びサンプルについての平均の正味の光学濃度(OD)範囲を、平均OD範囲から平均NSB ODを引き算することにより計算する。平均正味のOD = 平均範囲OD - 平均NSB OD

【0056】最大結合窪み(B<sub>0</sub>)の割合として標準液窪みの各対の結合を以下の公式を用いて計算する。

$$\text{【数1】} \quad \text{平均範囲} = \frac{\text{Net OD}}{\text{Net B}_0 \text{ OD}} \times 100$$

【0057】標準液についてのパーセント範囲とPGE<sub>2</sub>の濃度の関係をロジット-ログ紙を用いてプロットする。未知のPGE<sub>2</sub>の濃度を補間法により求めることができる。

【0058】パーセント範囲とPGE<sub>2</sub>濃度の代表的な標準曲線が図1に示されている。

【0059】エンドゲン・インコーポレイテッドのインターロイキン-1 ELISA

アッセイを、用意したanti-human IL-1 予備被覆ストリップウェルプレートで行う。

【0060】校正曲線の作成のため、標準液をIL-1濃度が400, 160, 64, 25.6, 10.24, 6.12, 3.06, 0 pg/mLの階段希釈溶液によって調製する。

【0061】50 μLの各標準液及びサンプルをそれぞれ1対の状態を試験用窪みに追加する。プレートを接着性プレートカバーで覆い、室温、即ち20~25で1時間かけて培養する。

【0062】50 μLのビオチン化(biotinylated)抗体試薬を窪みの各々に追加する。プレートを接着性プレートカバーで覆い、この場合も又、室温で1時間かけて培養する。

【0063】培養期間の終わりに、プレートカバーを注意深く取り除き、プレートを洗浄緩衝剤で3回洗浄する。3回目の洗浄後、プレートをペーパータオル上又は他の吸収材料上で軽く叩く。

【0064】100 μLのストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)を窪みの各々に追加する。新しい接着性プレートカバーを取り付け、プレートを室温で30分かけて培養する。

【0065】培養期間の終わりに、プレートカバーを注意深く取り除き、プレートを洗浄緩衝剤で3回洗浄する。プレートをペーパータオル上又は他の吸収材料上で軽く叩く。

【0066】100 μLの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンジヒドロクロリド(TMB)基質溶液を各窪みに追加する。プレートが室温で暗所において30分間基質溶液と反応するようにする。30分後、100 μLの停止液を各窪みに追加して反応を停止させる。

【0067】反応停止後30分以内に、プレートを450 nm～550 nmに設定されたプレート読取り装置で読み取る。550 nmでの読みを450 nmの読みから引き算する。2つの波長での読みは、微小滴定濃度のプレートの光学的な欠陥を補正する。標準曲線を用いて未知のサンプル中のIL-1の量を求める。標準曲線は、標準液の各々について得られた平均吸光度(450 nm～550 nm)とIL-1濃度の関係をプロットすることにより求められる。代表的なプロットが図2に示されている。未知数は、グラフ紙を用いて手作業で又は4パラメータロジスティック(算定)曲線をプロットする曲線当てはめ統計学的ソフトウェアパッケージを用いて求める。各サンプル中のIL-1の量を、標準曲線を用いて吸光度の値からIL-1濃度までを補間することにより求める。

#### 【0068】ピアス社のBCA試薬を用いるタンパク質アッセイ

ピアス社のBCAタンパク質アッセイは、バイシンコニン酸を含む試薬を用いてアルカリ性媒体中のタンパク質によりCu<sup>+2</sup>からCu<sup>+1</sup>への周知の還元と第一銅イオンの高感度且つ選択的な比色定量検出とを組み合わせている。このアッセイの紫色をした反応生成物は、BCAの2つの分子と1つの第一銅イオンのキレート化によって形成される。水溶性の錯体は、562 nmにおいてタンパク質濃度の広範な使用範囲にわたって線形である強い吸光度を呈する。

【0069】BCAタンパク質アッセイは、2種類のBCA試薬とアルブミン標準液から成る。BCA試薬Aは、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、バイシンコニン酸及び水酸化ナトリウム溶液中の酒石酸ナトリウムを含む。BCA試薬Bは、4%硫酸第二銅を含んでいる。BCA使用試薬(WR)を、BCA試薬A50部とBCA試薬Bを1部混合して調製する。WRは、室温で密閉容器内で数日間安定である。

【0070】アルブミン標準液は、0.9%食塩水及び0.05%アジ化ナトリウム中で2.0 mg/mL(2,000 µg/mL)の濃度でBovine Serum Albumin(BSA)を含む。標準液を稀釈液で稀釈して標準液を5 µg/mLの濃度に下げるのがよい。

【0071】25 µLの各標準液及び未知サンプルをピペットで適当な微小窪みプレートの窪み内へ移す。25 µLの稀釈液を空の窪みに用いる。

【0072】200 µLのWRを各窪みに追加する。プレートを30秒間プレートシェーカーで十分に混合する。プレートを覆って37°Cで30分間培養する。次に、プレートを室温まで冷却し、各窪みの吸光度を562 nmでプレート読取り装置で読み取る。

【0073】空の窪みの平均562 nm吸光度を全ての他の個々の標準液及び未知サンプルの読みから差し引く。標準曲線を、標準液の各々について平均ブランク補

正読みとその濃度(単位: µg/mL)の関係をプロットして作成する。標準曲線を用いて未知サンプルの各々のタンパク質濃度を求める。変形例として、上述の曲線当てはめソフトウェアを用いて未知の定量化を行ってもよい。

#### 【0074】実験例1-皮膚上における水の刺激反応度効果を測定する方法

非顕性効果を測定する方法の感度を求める手段として、2種類のマイルドな流体を選択して製品暴露後における炎症の可能性を求めた。計画した最もマイルドな流体のうち幾つかは、皮膚洗浄中に存在する水の異なるタイプ及び多くの局部スキンケア製品中の主要な成分であった。この例では、皮膚を脱イオン水及び水道水に暴露した後マーカとしてPGE<sub>2</sub>を用いて皮膚の炎症反応度を測定した。

【0075】以下の方法を次のようにして行った。

1. 皮膚表面上に存在する分泌液中に含まれたPGE<sub>2</sub>のベースライン(未処理の対照に相当する)レベルを、マイルドな接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルム、Sebutape(登録商標)(テキサス州ダラス所在のクダーム・コーポレーション)を、接着剤側を下に向けて皮膚に直接接触させた状態で皮膚上に載せることにより被検パネリストの下掌側前腕に沿って測定した。Sebutape(登録商標)を1分後皮膚から取り除き、次に、500 µL食塩水の入ったバイアル内に配置した。このSebutape(登録商標)収集過程を各Sebutape(登録商標)について1分間の接触時間で3回以上繰り返した。収集したサンプルを分析(以下に説明する)を行うまで-70°Cで貯蔵した。

【0076】2. 試験流体(脱イオン水又は水道水)を400 µL収容したHill Top chambers(登録商標)(オハイオ州シンシナティ所在のヒル・トップ・リサーチ)を被検パネリストの下掌側前腕に塗布した。4時間の暴露後、Hill Top chambers(登録商標)を取り除き、試験部位を水道水で濯ぎ洗いしてこれを軽く叩いて乾燥させた。

【0077】3. Hill Top chambers(登録商標)を取り外して腕を濯ぎ洗いし、そして軽く叩いて乾燥させた後、24時間後、皮膚表面上に圧出されたPGE<sub>2</sub>を含む皮膚分泌物を、上述したSebutape吸収法の上記段階ナンバー1で収集した。炎症性メディエータを試験生成物の暴露後又は皮膚への処理後任意の時点で収集でき、PGE<sub>2</sub>のレベルが暴露後短い時間たった後に対し24時間の時点で最も高いことを表したPGE<sub>2</sub>圧出の動力学的研究として皮膚上に圧出されたPGE<sub>2</sub>のレベルを暴露後約24時間たって測定することが望ましい。

【0078】収集したSebutape(登録商標)サンプルを以下の方法を用いて分析した。解凍後、サンプルを15分間かけて音波破碎し激しく渦が生じるように掻き混ぜた。抽出タンパク質及びエイコサノイドを含む溶液を、

免疫測定法（アッセイ・デザインズ社のHigh Sensitivity PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassayナンバー93001）によりPGE<sub>2</sub>のレベルにつき、そして、バイシンコニン酸（BCA）タンパク質アッセイ（イリノイ州ロックフォード所在のピラス・ケミカル・カンパニーのキットナンバー23225）を用いて全タンパク質のレベルについて分析した。

【0079】各試験部位から4つのSebutape（登録商標）サンプルを採取した。PGE<sub>2</sub>（単位：pg/mL）の測定レベルを、各Sebutape（登録商標）ストリップから抽出したタンパク質の総量（単位：μg/mL）に対して標準化した。次に、4つの標準化した値を平均化して各試験部位について圧出されたPGE<sub>2</sub>のレベル（単位：pg/μg）を求めた。人によって異なることを考慮して、各パネリストについてPGE<sub>2</sub>レベルを未処理の対照について測定したPGE<sub>2</sub>のレベルに対して更に標準化した。

【0080】上述の方法を用いて脱イオン水の刺激反応度と比較した水道水によって誘発された刺激反応度のレベルが、表1に示されている。

【表1】 PGE<sub>2</sub>の標準化レベル（無次元単位）

パネリスト	脱イオン水	水道水
1	0.40	0.52
2	0.56	0.85
3	0.62	0.89
4	0.69	0.72
5	0.92	1.41
6	0.84	1.51
7	0.93	1.40
8	1.71	1.45
9	1.01	2.33
10	0.94	2.08
平均	0.86	1.32

IL-1αの標準化レベル（無次元単位）

脱イオン水中のSLS濃度 (w/w%)	IL-1αのレベル (無次元単位)
0	1.35
5	2.83
10	2.71
20	1.00

【0084】表2は、SLSの種々の濃度に対する皮膚の暴露後におけるIL-1の用量依存データを示している。炎症反応度マーカ又は反応の量は、陰イオン系界面活性剤SLSのレベルが増大すると増大すると予想される。これは低SLSレベルで観察されるが、これは、研究において試験されたSLSの最も高い濃度では見られず、この方法の堅牢性に関する潜在的な問題が生じる。理論的な説明はともかく、陰イオン系界面活性剤、

\*【0081】表1に示すように、この方法は、様々なタイプの水道水によって誘発された炎症反応度又は刺激反応度のレベルを識別することができ、それにより脱イオン水よりも約35%以上の炎症性メディエータPGE<sub>2</sub>を皮膚表面上に圧出させる。

【0082】実験例2 - 陰イオン系界面活性剤とインターロイキン-1アルファ（IL-1）の考えられる相互作用

炎症反応度又は刺激反応度のマーカとしてIL-1を用いた場合の問題のうちの1つは、IL-1が、局所スキンケア配合物中に含まれている場合の多い界面活性剤と相互作用をする恐れがあるということである。この実験例は、皮膚上に圧出されたIL-1の見掛けのレベルによって測定されたこの相互作用を試験流体中の硫酸ラウリルナトリウム（SLS、イリノイ州ノースフィールド所在のステパン・カンパニー）の関数として示している。

【0083】実験例1に記載した方法を用いてSLSの稀釈溶液により引き起こされた刺激反応度のレベルをSLS濃度の関数として評価したが、異なる点は、PGE<sub>2</sub>ではなくインターロイキン-1（IL-1）のレベルを用いて刺激反応度の程度を評価したことである。IL-1のレベルを免疫測定法（マサチューセッツ州モバーン所在のエンドゲン・インコーポレイテッドのHuman IL-1 KitナンバーEH2-IL1a）によりIL-1のレベルを測定した。PGE<sub>2</sub>の場合と同様、PGE<sub>2</sub>（単位：pg/mL）の測定レベルを、各Sebutape（登録商標）ストリップから抽出したタンパク質の総量（単位：μg/mL）に対して標準化した。人によって異なることを考慮し、未処理の対照について測定したIL-1のベースラインレベルを用いて各治療部位についてのIL-1レベルを更に標準化した。データは以下に表2に示されている。

【表2】

例えば、SLSの高い濃度がタンパク質、例えば、IL-1と相互作用し、タンパク質の変性を引き起こすことが考えられる。このプロセスは、免疫測定法に影響を及ぼし、その結果、最も高いSLS濃度のところでこの実験において観察されるIL-1の見掛けのレベルが低くなる場合がある。免疫測定法を用いてIL-1のレベルについて分析を行う際、SLSは、タンパク質の立体配座（コンフォメーション）を変える場合があり、

アッセイで用いられる抗体によってこれが認識できないようになる。かくして、刺激反応度の度合いを評価するようIL-1のレベルを用いることは、このような潜在的な界面活性剤とタンパク質の相互作用に起因して制限される。

【0085】実験例3 - マイルドな顔用クレンザーに起因する炎症反応度

実験例1の方法を拡張してマイルドな顔面クレンザー

(カリフォルニア州ロサンゼルス所在のニュートロジー\*  
マイルドな顔用クレンザーの組成

純水
グリセリン
ラウリルグルコシド
デシルグルコシド
ココミドプロピルベタイン
ココミドDEA
グリセレス-7
硫酸ラウレルアンモニウム
ソディウムココイルサルコシネート (Sodium Cocoyl Sarcosinate)
グリコールステアレート
PEG-120 メチルグルコースジオリエート
テトラソディウムEDTA
DMDMヒダントイン
クエン酸
フレグランス

【0087】上述の方法を用いて脱イオン水により誘発された刺激反応度のレベルと比較した場合の顔用クレンザーにより誘発された刺激反応度のレベル(PGE<sub>2</sub>の圧出レベルにより指示される)が表4に示されている。

【表4】 PGE<sub>2</sub>の標準化レベル(無次元単位)

パネリスト	脱イオン水	顔用クレンザー
1	1.98	1.81
2	1.48	1.26
3	1.30	0.67
4	0.83	2.11
5	1.49	1.72
6	2.12	3.07
7	1.25	2.38
8	1.60	3.03
9	1.77	3.05
10	1.45	0.85
平均	1.53	2.00

【0088】表4の結果の示すところによれば、上述の方法を用いてこれらマイルドな生成物の炎症反応度を識別することができる。このマイルドな顔用クレンザーへの皮膚の暴露の結果として、脱イオン水よりも炎症反応度又は刺激反応度が大きい、マイルドなクレンザーにより引き起こされた刺激反応度のレベルは、脱イオン水

\*ナ・コーポレイションのNeutrogena Fresh Foaming Cleanser)の稀釈溶液(脱イオン水に溶かした8%w/w)によって誘発された炎症反応度又は刺激反応度のレベルを脱イオン水の炎症反応度又は刺激反応度のレベルと比較して測定した。

【0086】クレンザーの配合物の成分が表3に一覧表示されている。

【表3】

だけで引き起こされた刺激反応度のレベルよりも約24%大きいものであるに過ぎない。

【0089】本明細書に記載した数値による刺激反応度の結果は絶対のものではなく、これらは特定の年代のパネリストの特定の集団について得られたものであるということを理解するのは重要なことである。人が異なれば局部スキンケア製品が同一であってもこれに暴露した場合には異なる炎症反応を生じることは知られている。加うるに、1年のうちの暖かく湿度の高い時期(即ち、夏)の間、角質に対する損傷は、1年のうちの寒くて乾燥した時期(即ち、冬)の間よりも効果が低いということも知られている。かくして、これらの変数を考慮に入れるのでなければ、異なる研究の各々について測定された実際の値を相互に比較しないようにすることが重要である。

【0090】実験例4 - 外部攻撃への暴露

本発明の方法は又、外部攻撃、例えば、局部スキンケア製品のアプリケーションにより引き起こされる刺激反応度を検査するよう拡張できる。この実験例では、乳幼児用のタオル(Gerber(登録商標)Baby Washcloth)でスクラブングすることにより生じる炎症反応度又は刺激反応度のレベルを、普通のタオル(フィールドクレスト・キャン・インコーポレイテッドの一部門のSt. Mary's(登録商標))を用いることにより生じる刺激反応度のレベルと比較した。

【0091】炎症反応度又は刺激反応度を評価するのに用いた方法は、実験例1の方法と似ており、異なる点は、Hill Top Chamber（登録商標）を用いて刺激原を腕に塗布する代わりに、以下に述べるスクラビングプロトコルを用いたことにある。各タオル（Baby Cotton Wash cloth 対 Regular Cotton Washcloth）をJohnson's（登録商標）Head-to-Toe（商標）Baby Wash（ニュージャージー州スキルマン所在のジョンソン・アンド・ジョンソン・コンシューマー・プロダクツ・カンパニー、表5に示した成分の一覧表）の水道水8%（w/w）希釈溶液で飽和させた。掌側前腕の各部位を2分間スクラビングした。洗浄後、腕を水ですすぎ洗いして軽く叩いて乾燥させた。PGE<sub>2</sub> レベルを分析し、かかるレベルは表6に記録されている。

【表5】 乳幼児用洗浄剤の組成

水
PEG-80 ソルビタンラウレート
硫酸ラウレスナトリウム
ココミドプロピルベタイン
PEG-150 ジステアレート
ソディウムラウロアンフォ PG-アセテートホスフェート
グリセリン
ポリクオテルニウム-10
フレグランス
クオテルニウム-15
テトラソディウム EDTA

【表6】 PGE<sub>2</sub> の標準化レベル（無次元単位）

パネリスト	乳幼児用洗面タオル	普通の洗面タオル
1	0.84	1.31
2	1.08	0.88
3	1.13	1.19
4	1.02	1.08
5	0.87	1.29
6	1.35	0.89
7	1.17	0.92
8	0.70	1.13
9	1.17	1.29
10	0.57	1.10
平均	0.99	1.11

【0092】表6で分かるように、本発明の方法は、外部攻撃への暴露により引き起こされる炎症反応度又は刺激反応度のレベルを互いに識別するのに有用である。本発明の方法は、乳幼児用のタオルでスクラビングした場合と通常のタオルでスクラビングした場合の方向性のある差を指示し、乳幼児用のタオルでスクラビングした場合には、通常のタオルでスクラビングした場合と比べて刺激反応度の度合いが低い。

30

40

50

【0093】実験例5 - 局部スキンケア製品と関連した外部攻撃

本発明の方法は、互いに異なる局部スキンケア製品とそれに伴う外部攻撃への暴露の比較に適用できる。この実験例では、乳幼児の浴用希釈溶液で洗い落とした場合を水道水だけで洗い落とした場合と比較した。乳幼児浴用希釈溶液は、Johnson's（登録商標）Head-to-Toe（商標）Baby Wash（ニュージャージー州スキルマン所在のジョンソン・アンド・ジョンソン・コンシューマー・プロダクツ・カンパニー、表5に前に示した成分の一覧表）の水道水10%（w/w）希釈溶液であった。

【0094】炎症反応度又は刺激反応度を実験例1に記載したように評価し、異なる点は、Hill Top Chamber（登録商標）を用いるのではなく、2 mLの水又は2 mLの乳幼児浴用希釈溶液を用い、Dia-stron（登録商標）Wash Simulator（ペンシルベニア州メディア所在のサイバードーム・インコーポレイテッド）を用いて掌側前腕を洗浄した。各部位を2分間スクラビングした。スクラビング後、腕を水ですすぎ洗いし、軽く叩いて乾燥させた。PGE<sub>2</sub> の結果が表7に一覧表示されている。

【表7】 PGE<sub>2</sub> の標準化レベル（無次元単位）

パネリスト	水道水によるスクラビング	乳幼児用洗浄剤によるスクラビング
1	0.68	0.62
2	0.76	0.62
3	1.22	0.50
4	1.28	0.30
5	1.29	0.67
6	0.90	0.65
7	0.47	0.44
8	1.40	0.66
9	0.21	0.11
10	0.11	0.17
平均	0.83	0.47

【0095】表7に示すように、本発明の方法は、局部スキンケア製品の相対的な刺激反応度をそれに伴う外部攻撃への暴露中に検査するのに用いることができる。水道水だけで洗浄した場合は、マイルドな乳幼児浴用溶液で洗浄した場合よりも刺激反応度の度合いが高いことが示されている。

【0096】実験例6 - I L - 1 のレベルによる外部攻撃の評価

先の実験例は、PGE<sub>2</sub> が局部スキンケア製品への暴露又は外部攻撃への暴露に起因する炎症反応度又は刺激反応度のレベルを互いに識別できることを立証した。加うるに、先に行った作業は、サイトカインレベル、例えば、I L - 1 と硫酸ラウリルナトリウムにより引き起こされた炎症の程度の相関関係を示すと共に重度の疾患症状を特徴づけるためにサイトカインの使用法を示して

いる。この実験例では、外部攻撃、例えば、局部スキンケア製品を皮膚に塗布する方法により引き起こされる炎症反応度又は刺激反応度のレベルの測度としてIL-1のレベルのモニタに本発明の方法をどのように適用できるかが示されている。この実験例では、乳幼児用のタオルでスクラビングすることにより引き起こされる炎症反応度又は刺激反応度のレベルを、通常のタオルを用いた場合の刺激反応度のレベルと比較する。

【0097】2種類のアプリケーションによって引き起こされた相対的な刺激反応度を実験例1の方法を用いて評価したが、異なる点は、以下のスクラビングプロトコルをHillTop Chamber（登録商標）に代えて用いたことにある。各タオル（Baby Cotton Washcloth - Gerber（登録商標）Baby Washcloth、Regular Cotton Washcloth - フィールドクレスト・キャノン・インコーポレイテッドの一部部門のSt. Mary's（登録商標））を、Johnson's（登録商標）Head-to-Toe（商標）Baby Wash（ニュージャージー州スキルマン所在のジョンソン・アンド・ジョンソン・コンシューマー・プロダクツ・カンパニー、先に表5に示した成分の一覧表）の水道水8%（w/w）希釈溶液で飽和させた。掌側前腕上の各部位を2分間スクラビングした。洗浄後、腕を水ですすぎ洗いし、軽く叩いて乾燥させた。また、実験例1とは対照的に、IL-1レベルをPGE<sub>2</sub>ではなく炎症反応度又は刺激反応度のレベルの測度としてモニタした。IL-1のレベルを免疫測定法（エンドゲン社のHuman IL-1アルファキットナンバーEH2-IL1a）により測定し、これらの値は表8に記録されている。

【表8】 IL-1αの標準化レベル（無次元単位）

パネリスト	乳幼児用洗面タオル	普通の洗面タオル
1	0.73	0.52
2	1.59	0.79
3	0.97	1.44
4	0.92	1.78
5	0.50	0.46
6	0.42	0.36
7	0.27	1.00
8	1.54	1.96
9	1.23	2.62
平均	0.91	1.22

【0098】表8で分かるように、IL-1の測定値を用いると、外部攻撃への暴露により、例えば、種々のタイプの布でスクラビングすることにより引き起こされる炎症反応度又は刺激反応度のレベルを互いに識別することができる。乳幼児用タオルによるスクラビングは、通常のタオルによるスクラビングよりも刺激反応度の度合いが小さい。

【0099】加うるに、局部スキンケア製品及び（又

10

20

30

40

50

は）外部攻撃への暴露により引き起こされる炎症反応度又は刺激反応度のより完全な指示は、PGE<sub>2</sub>と関連してIL-1のレベルをモニタすることにより得ることができる。実験例4におけるPGE<sub>2</sub>について先に示された結果とこの実験例の結果を組み合わせることにより、種々のタイプの布によるスクラビングが炎症反応度に関する効果についての一層包括的な理解が得られる。というのは、サイトカイン経路及びアラキドン酸経路の一次炎症前メディエータを測定しているからである。

【0100】本発明の具体的な実施態様は、以下の通りである。

(1) 前記非侵襲的収集器具は、非被覆非孔質プラスチックフィルム、非被覆微孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した非孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルム、繊維状ウェブの織布、繊維状ウェブの不織布、天然スポンジ、合成スポンジ及びプラスチックフォームから成る群から選択された器具であることを特徴とする請求項1記載の方法。

(2) 前記非侵襲的収集器具は、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルムであることを特徴とする実施態様(1)記載の方法。

(3) 前記エイコサノイドは、プロスタグランジンであることを特徴とする請求項1記載の方法。

(4) 前記プロスタグランジンは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(3)記載の方法。

(5) エイコサノイドのレベルは、RIA、EIA及びELISAから成る群から選択された少なくとも1つの免疫測定法を用いて分析されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【0101】(6) エイコサノイドのレベルは、GC/MS、HPLC及びTLCから成る群から選択された少なくとも1つの免疫測定法を用いて分析されることを特徴とする請求項1記載の方法。

(7) 前記器具によって前記皮膚の表面から収集された分泌物中の少なくとも1つのサイトカインのレベルを分析する段階を更に有していることを特徴とする請求項1記載の方法。

(8) 前記サイトカインは、インターロイキン-1であることを特徴とする実施態様(7)記載の方法。

(9) 前記サイトカインは、インターロイキン-1であり、前記エイコサノイドは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(7)記載の方法。

(10) 前記非侵襲的収集器具は、非被覆非孔質プラスチックフィルム、非被覆微孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した非孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルム、繊維状ウェブの織布、繊維状ウェブの不織布、天然スポンジ、合成スポンジ及びプラスチックフォームから成る群から選択された器具であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【0102】(11)前記非侵襲的収集器具は、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルムであることを特徴とする実施態様(10)記載の方法。

(12)前記エイコサノイドは、プロスタグランジンであることを特徴とする請求項2記載の方法。

(13)前記プロスタグランジンは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(12)記載の方法。

(14)エイコサノイドのレベルは、RIA、EIA及びELISAから成る群から選択された少なくとも1つの免疫測定法を用いて分析されることを特徴とする請求項2記載の方法。

(15)エイコサノイドのレベルは、GC/MS、HPLC及びTLCから成る群から選択された少なくとも1つの免疫測定法を用いて分析されることを特徴とする請求項2記載の方法。

【0103】(16)前記段階(c)の前後において、前記器具により前記皮膚の表面から収集された分泌物中の少なくとも1つのサイトカインのレベルを測定する段階を更に有していることを特徴とする請求項2記載の方法。

(17)前記サイトカインは、インターロイキン-1であることを特徴とする実施態様(16)記載の方法。

(18)前記サイトカインは、インターロイキン-1であり、前記エイコサノイドは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(16)記載の方法。

(19)前記段階(d)は、前記段階(c)の実施後約24時間の時点で実施されることを特徴とする請求項2記載の方法。

(20)皮膚の分泌物中のタンパク質のレベルを測定し、エイコサノイドのレベルをタンパク質のレベルに対して標準化する段階を更に有していることを特徴とする請求項2記載の方法。

【0104】(21)前記非侵襲的収集器具は、非被覆非孔質プラスチックフィルム、非被覆微孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した非孔質プラスチックフィルム、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルム、繊維状ウェブの織布、繊維状ウェブの不織布、天然スポンジ、合成スポンジ及びプラスチックフォームから成る群から選択された器具であることを特徴とする請求項3記載のキット。

(22)前記非侵襲的収集器具は、接着剤を塗布した微孔質プラスチックフィルムであることを特徴とする実施態様(21)記載のキット。

(23)前記免疫測定法手段は、RIA、EIA及びELISAから成る群から選択されていることを特徴とする請求項3記載のキット。

(24)前記免疫測定法手段は、ELISAであることを特徴とする請求項3記載のキット。

\* (25)前記エイコサノイドは、プロスタグランジンであることを特徴とする請求項3記載のキット。

【0105】(26)前記プロスタグランジンは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(25)記載のキット。

(27)前記免疫測定法手段は、前記エイコサノイドの抗体と、前記免疫測定を実施する多数の窪み付きプレートとから成ることを特徴とする請求項3記載のキット。

(28)前記免疫測定法手段は、前記エイコサノイド又は前記抗体と共役関係をなす酵素を更に有していることを特徴とする実施態様(27)記載のキット。

(29)前記酵素のための基質を更に有していることを特徴とする実施態様(28)記載のキット。

(30)前記分泌物中のサイトカインのレベルを更に測定する免疫測定法手段を更に有していることを特徴とする請求項3記載のキット。

【0106】(31)前記サイトカインは、インターロイキン-1であることを特徴とする実施態様(30)記載のキット。

(32)前記サイトカインは、インターロイキン-1であり、前記エイコサノイドは、プロスタグランジンE<sub>2</sub>であることを特徴とする実施態様(30)記載のキット。

(33)前記キットは、哺乳動物の皮膚の少なくとも1つの局部スキンケア製品、少なくとも1つの外部攻撃又はこれらの組合せへの暴露に起因する哺乳動物の皮膚の非顕性又は顕性炎症反応度又は刺激反応度を測定するのに用いられることを特徴とする請求項3記載のキット。

【0107】

【発明の効果】本発明の構成によれば、皮膚上に圧出され又は分泌された特定のマーカ、例えば、エイコサノイド(PGE<sub>2</sub>)によって例示されるプロスタグランジンを含む)のレベルを用いて局部スキンケア製品、外部攻撃に対する皮膚の暴露、又はこれらの組合せにより皮膚上に誘発された非顕性又は顕性の皮膚刺激反応度又は炎症反応度を定量化することができる。本発明において利用されるエイコサノイドの測定により、非常にマイルドなスキンケア製品相互を識別し又は外部攻撃への暴露を識別する上で必要な感度が得られ、他方、従来技術の方法と関連したタンパク質の変性に関する問題が解決される。また、本発明の高感度の測定方式を利用すると、局部スキンケア製品を長期間にわたって消費者について試験する必要なく、かかる製品の刺激反応度プロフィールを短期間で又は1回使用後に決定できる。

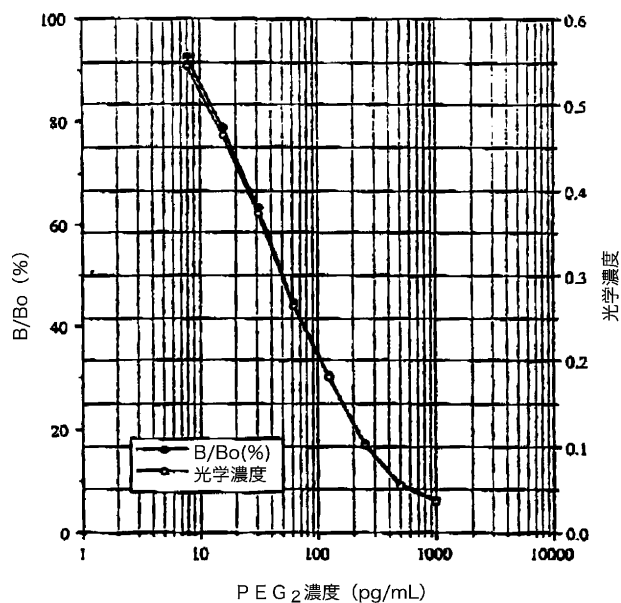
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の幾つかの実施形態で用いられるPGE<sub>2</sub>の決定のための免疫学的検定に関する校正曲線を示す図である。

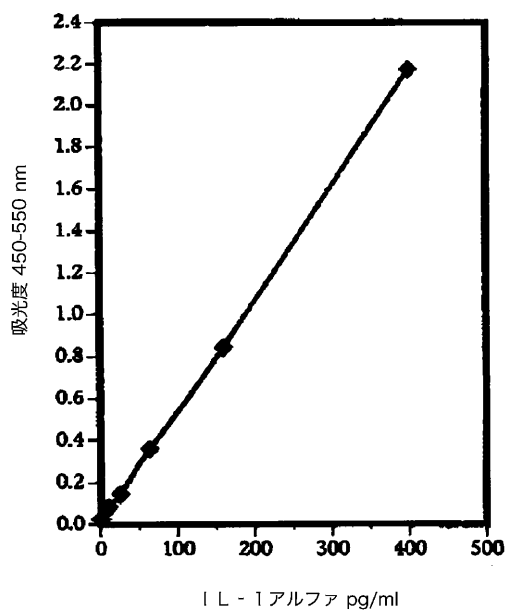
【図2】本発明の幾つかの実施形態で用いられるIL-1の決定のための免疫学的検定についての校正曲線を

示す図である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup> G 0 1 N 33/88	識別記号	F I A 6 1 B 5/10	テ-マコード(参考) 3 0 0 Q
(71)出願人 598039367 Grandview Road, Skil lman, New Jersey 08558, United States of Am erica		(72)発明者 ニーナ・ティアニー アメリカ合衆国、19067 ペンシルベニア 州、ヤードレー、ドリユー・ドライブ 1081	
(72)発明者 ケリー・ヒュアング アメリカ合衆国、08844 ニュージャージ ー州、ヒルズボロー、ローリエン・プレイ ス 3		(72)発明者 ベンジャミン・ウィーガンド アメリカ合衆国、18940 ペンシルベニア 州、ニュータウン、ファームビュー・ドラ イブ 2028	
		F タ-ム(参考) 2G045 BA20 BB41 CB09 DA36 DA59 FB03 4C038 VA04 VB22 VC20	

## 【外国語明細書】

## 1. Title of Invention

METHOD AND KIT FOR MEASURING SKIN INFLAMMATION  
OR IRRITATION

## 2. Claims

1. A method for measuring a marker of clinical or sub-clinical inflammation or irritation of mammalian skin, comprising the steps of:
  - (a) collecting secretions from the surface of the skin using a non-invasive collection procedure, said non-invasive collection procedure utilizing a non-invasive collection device; and
  - (b) analyzing the level of at least one eicosanoid in the secretions collected from the skin surface by said device.
2. A method for measuring sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian skin from exposure of said skin to a topical skin care product, exposure to an external aggression or combinations thereof, said method comprising the steps of:
  - (a) collecting secretions from the surface of said skin using a non-invasive collection procedure comprising a non-invasive collection device;
  - (b) measuring a baseline level of eicosanoid in the secretions collected from the surface of said skin;
  - (c) exposing said skin to a topical skin care product, to an external aggression or combinations thereof;
  - (d) collecting secretions from the surface of said skin using a non-invasive collection device after step (c);
  - (e) measuring the level of eicosanoid in the secretions collected from the surface of said skin after step (c); and
  - (f) comparing the level of eicosanoid determined in step (e) with the level of eicosanoid determined in step (b).
3. A kit for measuring a marker of sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian skin, said kit comprising:
  - (a) a non-invasive collection device for collecting secretions from the surface of said skin; and
  - (b) an immunoassay for measuring levels of eicosanoid in said secretions.

### 3. Detailed Description of Invention

#### CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of co-pending provisional application serial number 60/317638 filed on September 6, 2001.

#### FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to a method and kit for measuring skin inflammation or irritation. More particularly, the invention relates to a non-invasive, *in vivo* method and kit for measuring skin inflammation or irritation.

#### BACKGROUND OF THE INVENTION

Skin is the largest organ in the body, and its appearance has a large effect on one's self-confidence and quality of life. In fact, an initial impression of someone, which is long lasting, is often driven by the visual appearance (facial features, hair color, etc.) of the individual.

Consumers use skin care products to treat their skin conditions (e.g., acne, psoriasis, fine lines and wrinkles), improve skin health (e.g., dry, flaky skin; oily skin) or cover skin blemishes. There has been a tremendous amount of continued research into the development of new actives to improve the speed and efficacy of treatment of these various skin conditions, which has led to a plethora of new skin care formulations. These products often deliver against a specific skin care end benefit but need a longer time frame (eight to twelve weeks or longer) to maximize this benefit.

As the end benefit of these topical skin care products is being delivered over an extended period of time, it would be desirable to develop measurement capabilities to determine the irritation profiles of these products without having to test them with consumers

over the extended time period. In fact, sensitive measurements that could determine the irritation profile after a single use, when there are no visual by-products (*i.e.*, sub-clinical effects), such as inflammation, irritation, oedema, and erythema, would be highly preferred. In addition, exposure to external aggressions such as abrasion, friction, scrubbing, sun exposure, wind exposure, smoke exposure, other environmental exposures or the application and removal of an adhesive device such as a bandage to and from the skin, can also cause skin damage leading to inflammation or irritation, the degree of which is susceptible to measurement. The present invention provides a novel method and apparatus for measuring and quantifying such sub-clinical or clinical effects.

The inflammatory response of the skin caused by exposure to a skin care product or exposure to an external aggression is modulated by the keratinocytes within the skin primarily via two distinct pathways: the cytokine and the arachidonic acid pathway. Within these pathways, the various mediators that are expressed, secreted, or released are considered to be either a primary or secondary inflammatory mediator. Interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) is considered to be a primary pro-inflammatory mediator within the cytokine pathway, whereas prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is considered to be a primary pro-inflammatory mediator of the arachidonic acid pathway.

There are two main approaches for models that exist for the measurement of irritation or inflammation, *i.e.*, *in vitro* or *in vivo* measures. A review article entitled "Strategies for the assessment of acute skin irritation potential" (Robinson *et al.*, in *J. Pharmacol. Toxicol.*, 1999) provides a good overview of current *in vitro* skin corrosion and irritation testing methodologies, and is incorporated herein in its entirety by reference. A representative skin corrosion and irritation testing methodology is disclosed in US-A-6,020,148, the disclosure of which is incorporated herein in its entirety by reference, which discloses the use of an *in vitro* method to measure the ocular or dermal irritation of topical skin care products. The ocular or dermal irritation is quantified by measuring the viability of a model cell culture system after application of the skin care product. Different end markers can be measured using this technique, which can be monitored over time. Another methodology is disclosed in EP-A-

0,497,39, the disclosure of which is incorporated herein in its entirety by reference, which discloses the use of an *in vitro* model comprising a human skin co-culture of keratinocytes and fibroblasts to evaluate the irritancy of surfactants via cytotoxicity and pro-inflammatory endpoints. While these methods provide directional information on potential irritation or other clinical safety issues, the *in vitro* models do not accurately represent inflammation and irritation exhibited by human skin.

In addition, *in vivo* approaches have also been used to assess clinical safety of skin care products. Examples of *in vivo* approaches include: 4 hour patch testing (See Robinson, *et al.* review or Robinson *et al.*, in *Contact Dermatitis*, 1998, "Application of a 4-h human patch test method for comparative and investigative assessment of skin irritation") with the assessment of erythema after product patching; the use of suction blister fluid to measure IL-1 $\alpha$  and eicosanoids after 24 hour patch exposure (Muller-Decker *et al.*, in *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1998, "Arachidonic Acid Metabolism in Primary Irritant Dermatitis Produced by Patch Testing of Human Skin with Surfactants"); and the use of tape stripping and capsaicin to measure eicosanoid and cytokine levels in acute skin irritation (Reilly and Green, in *Acta. Derm. Venereol.*, 1999, "Eicosanoid and Cytokine Levels in Acute Skin Irritation in Response to Tape Stripping and Capsaicin"). An additional approach taught by Rheins, *et al.* WO 00/10579, "Method for Detection of Biological Factors in Epidermis" teaches the user to scrape the skin or use adhesive tape to strip the skin and then analyze for specific polynucleotides/cytokines. While these methods use human models, they involve an exaggerated use condition or a high degree of invasiveness during the procedure, which limits their usefulness as a clinical assessment tool. This is especially relevant, when evaluating sub-clinical irritation.

Over the last several years, Robinson *et al.* have disclosed non-invasive methodologies using Sebutape® (Cuderm Corporation, Dallas, Texas), an adhesive-coated microporous plastic film, to absorb pro-inflammatory cytokines as a marker of inflammation. In 1997, it was demonstrated that this methodology could be applied to the measurements of irritation on different body sites, as well as for individuals of different ages (Perkins, *et al.*,

Meeting of the Society of Toxicology, 1997, "Development of a noninvasive method for assessing human skin irritation"). Subsequent development showed that these inflammatory markers may correlate with skin conditions. Examples of the application of this methodology include the following: the correlation of Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and diaper rash severity (Perkins, *et al.*, Society of Toxicology Annual Meeting, 1998, "Further Development of a noninvasive method for assessing human skin irritation"), the correlation of IL-1 $\alpha$  and sub-clinical irritation (without visible erythema) due to sodium lauryl sulfate (SLS) application (Perkins, *et al.*, Society of Investigative Dermatology Annual Meeting, 1999, "Noninvasive method for assessing inflammatory changes in chemically treated human skin"), and the assessment of the severity of inflammatory scalp conditions (Cardin, *et al.*, Society of Toxicology Annual Meeting, 2001, "Development of a noninvasive method for recovery of molecular markers of normal and compromised scalp conditions"). One of the potential issues that could arise when using interleukins or other proteins as a marker of inflammation is their potential interaction with the skin care product being tested. For example, it is thought that the interactions of these proteins with anionic surfactants found in some skin care products can lead to protein denaturation, which could affect their apparent levels during analysis. Therefore, the development of a lipid-based marker that would retain stability in the presence of a wide variety of skin care products or other test compounds would be preferred and would overcome the above-mentioned difficulties associated with using proteins, such as interleukins, as an inflammation/irritation marker. In addition, the method should be able to measure not only the effects of topical skin care products on the skin, but also the effects of exposure to the above-referenced external aggressions.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment, the present invention is directed to a method for measuring a marker of sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian (animal or human) skin by the collection and measurement of the amount of an eicosanoid, preferably, prostaglandin, more preferably, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), present on the skin surface. The method of the invention, including the steps of:

- (a) collecting secretions from the surface of the skin using a non-invasive collection procedure, said non-invasive collection procedure utilizing a non-invasive collection device; and
- (b) analyzing the level of at least one eicosanoid in the secretions collected from the skin surface by said device.

The measurement of eicosanoids provides the needed sensitivity to differentiate between very mild skin care products or exposure to external aggressions, while obviating any concern of protein denaturation associated with prior art methods.

Another embodiment of the invention is directed to a method of measuring the sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian skin due to exposure of the skin to a topical skin care product, an external aggression or combinations thereof. This embodiment of the method of the invention, includes the steps of:

- (a) collecting secretions from the surface of said skin using a non-invasive collection procedure including a non-invasive collection device;
- (b) measuring a baseline level of eicosanoid in the secretions collected from the surface of said skin;
- (c) exposing said skin to at least one topical skin care product, to at least one external aggression or combinations thereof;
- (d) collecting secretions from the surface of said skin using a non-invasive collection procedure including a non-invasive collection device after step (c);
- (e) measuring the level of eicosanoid in the secretions collected from the surface of the skin after step (c); and
- (f) comparing the level of eicosanoid determined in step (e) with the level of eicosanoid determined in step (b).

Preferably, the eicosanoid is prostaglandin and, more preferably, is prostaglandin E<sub>2</sub>. Preferably, step (d) of the method is performed about 24 hours after step (c).

The non-invasive collection device may include a device selected from the group consisting of an uncoated non-porous plastic film, an uncoated microporous plastic film, an

adhesive-coated non-porous plastic film, an adhesive-coated microporous plastic film, a woven fibrous web, a non-woven fibrous web, a natural sponge, a synthetic sponge and a plastic foam.

In another embodiment, the method further includes the step of analyzing the level of at least one cytokine in the secretions collected from the skin surface by the device. Preferably, the cytokine is interleukin-1 $\alpha$ . Most preferably, the cytokine is interleukin-1 $\alpha$  and the eicosanoid is prostaglandin E<sub>2</sub>.

In yet another embodiment, the method further includes the step of measuring the level of protein in the skin secretions and normalizing the level of eicosanoid to the level of protein.

Another aspect of the invention is directed to a kit for measuring markers for clinical or sub-clinical inflammation or irritation of mammalian skin. The kit includes:

- (a) a non-invasive collection device for collecting secretions from the surface of the skin; and
- (b) an immunoassay for measuring levels of eicosanoid in the secretions.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a calibration curve for an immunoassay for the determination of PGE<sub>2</sub> used in some embodiments of the invention.

Fig. 2 is a calibration curve for an immunoassay for the determination of IL-1 $\alpha$  used in some embodiments of the invention.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The levels of a specific marker, such as a cytokine (including interleukin-1 $\alpha$ ) or an eicosanoid (including a prostaglandin, exemplified by PGE<sub>2</sub>) expressed or secreted on the

skin, may be used to quantify sub-clinical or clinical skin irritation or inflammation induced on the skin by a topical skin care product, by exposure of the skin to an external aggression or combinations thereof. In addition, measuring a combination of markers, such as an eicosanoid and a cytokine, may be used to provide a more complete picture of the amount of sub-clinical or clinical skin irritation or inflammation.

As used herein, the term "topical skin care product" refers to a personal cosmetic, toiletry, or healthcare product such as dry or wet wipes, washes, baths, shampoos, gels, soaps, sticks, balms, sachets, pillows, mousses, sprays, lotions, creams, cleansing compositions, powders, oils, deodorants, bath oils and other bath compositions which may be added to a bath. Topical skin care products may also include, but are not limited to, aerosols, candles, and substances that may be used with vaporizers. The aforementioned topical skin care products are well known to those skilled in the art.

As used herein, the term "external aggression" refers to a stimulus other than a personal care product that can cause irritation or inflammation to the skin. Illustrative examples of external aggressions include abrasion, friction, scrubbing, sun exposure, wind exposure, smoke exposure, other environmental exposures or the application and affixing and removal of an adhesive-coated device such as an adhesive bandage to and from the skin.

As used herein, the term "non-invasive collection procedure" refers to a procedure for collection of secretions from the skin surface that does not cause visible erythema during collection.

As used herein, the term "non-invasive collection device" refers to a device for collection of secretions from the skin surface that does not cause visible erythema during collection.

The method of the invention measures the irritation of the skin in response to treatment with a topical skin care product, exposure to an external aggression or a

combination thereof. The topical skin care product may be applied to the skin with a wide variety of devices, including, but not limited to patches, cotton balls, wipes, chambers and the like. An example of an occlusive patch that can be used to expose the skin to a topical skin care product is a Hill Top chamber® (Hill Top Research, Cincinnati, Ohio). This patch includes a molded plastic chamber within which a non-woven Webril® pad (BBA Nonwovens, Simpsonville, SC) holds the topical skin care product. The chamber is applied to the skin using a semi-occlusive, hypo-allergenic adhesive tape. The topical skin care product may be applied to the skin for various lengths of time, for example, ranging from one minute to 24 hours. Examples of exposure to external aggressions include, but are not limited to, scrubbing with wash cloths, wipes, pouffs, bathing implements, exposure of skin to the sun, smoke, wind or other environmental agents, or friction resulting from the wear of clothing. The length of exposure of the external aggression may range, for example, from one minute to one year and in some cases may encompass even a lifetime of exposure.

Following the exposure of the skin to the topical skin care product or external aggression, a non-invasive collection device is used to absorb or collect inflammatory mediators contained in skin secretions present on the skin surface. An example of a suitable non-invasive device for absorbing or collecting mediators from the skin is a mild-adhesive-coated microporous plastic film, such as Sebutape® (available from Cuderm Corporation, Dallas, Texas). The collection of the inflammatory mediator can occur at varying times after exposure to a topical skin care product or external aggression, ranging from immediately after exposure to 24 hours or longer after exposure. For example, the inflammatory mediator may be collected one hour, three hours or 24 hours after exposure of the skin to the topical skin care product or external aggression. We have found in a study of the kinetics of PGE<sub>2</sub> expression that the levels of PGE<sub>2</sub> were highest 24 hours following exposure versus the shorter times. However, in cases of cumulative effects, it may be appropriate to take measurements as a function of time throughout a lifetime of exposure.

Other suitable non-invasive collection devices include devices selected from the group consisting of an uncoated non-porous plastic film, an uncoated microporous plastic film, an

adhesive-coated non-porous plastic film, an adhesive-coated microporous plastic film, a woven fibrous web, a non-woven fibrous web, a natural sponge, a synthetic sponge and a plastic foam.

Following collection by the non-invasive collection device, the level of the inflammatory mediator is analyzed using one or more of a variety of different analytical techniques. Exemplary analytical techniques useful in the practice of the invention include, but are not limited to immunoassay techniques and instrumental analytical techniques.

Exemplary immunoassay techniques useful in the practice of the invention include immunoassay techniques such as radioimmunoassay (RIA), fluorescence immunoassay (FIA), enzyme immunoassay (EIA), and enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). Immunoassay techniques are used to identify and quantify analytes using antibody-antigen reactions. The antibodies used in the immunoassays may be either polyclonal or monoclonal antibodies. In one approach known as a "sandwich" immunoassay, an antibody to the analyte to be measured is immobilized onto a solid surface such as a bead or a plastic (microtiter) plate. A test sample containing the analyte to be measured is mixed with the antibody beads or placed in the plastic plate, resulting in the formation of an antibody-analyte complex. An indicator reagent composed of a second antibody that carries, or is conjugated to an indicator is then added to the mixture. The indicator may be a radioisotope for RIA, an enzyme for EIA or for ELISA, or a fluorophore for FIA. The most commonly used enzymes in EIA or ELISA are horseradish peroxidase and alkaline phosphatase. The antibody-indicator conjugate binds to the first antibody-analyte complex, free antibody-indicator conjugate is washed away, and the antibody-analyte-antibody-indicator complex is quantified using a method compatible with the indicator reagent. For example, in the case of an enzyme immunoassay, quantitation is effected by the addition of a substrate that reacts with the enzyme.

In an alternate approach known as a competitive binding immunoassay, an analyte in the sample to be measured competes with a known amount of added analyte that has been

labeled with an indicator (analyte-indicator conjugate) that binds to the immobilized antibody. After reaction, the free analyte-analyte-indicator solution is washed away from the solid phase. The analyte-indicator on the solid phase or remaining in the wash solution is then used to quantify the amount of analyte present in the sample as measured against a control assay using only an analyte-indicator. This is done using a method appropriate for the assay, for example, enzyme activity, fluorescence, radioactivity, and the like.

In an alternate approach known as the displacement method, a displacement rather than a competitive reaction is used, in which the analyte displaces analyte-indicator bound to the antibody.

Conjugation involves the chemical linkage of the antibody or antigen to another molecule such as a radioisotope; an enzyme such as peroxidase, alkaline phosphatase or glucose oxidase; or a fluorophore such as fluorescein or rhodamine B. Noncovalent methods for conjugating antibodies and antigens may also be used. For example, in one approach, the antigen and/or the antibody are labeled using either biotin or streptavidin, and the conjugates may then be used in either a competitive or displacement type immunoassay. The advantage in the use of such conjugates is the extremely high affinity constant of the avidin-biotin complex, estimated at approximately  $10^{14}$  L/mol.

Traditionally, EIAs have been developed with multi-well plates, for example, 96-well microtiter plates, which provide the immobilization support for the assay, the reaction vessel, and, when linked to a spectrophotometer-based reader, a rapid means for detecting and quantifying the color resulting from interaction of a substrate with the antibody-antigen-enzyme complex.

There are many variations to the basic EIA. For example, an EIA may utilize enzyme amplification to increase the speed and sensitivity of an immunoassay. In this approach, the enzyme label in the EIA produces a substance that triggers a second enzyme-based system that can generate large quantities of color in a very short time. Thus, the product of the

enzymatic activity of the antigen-antibody-enzyme complex does not need to be directly detected; rather, it can serve as a catalyst to begin the second reaction. The second enzyme system can be present in relatively large quantities, facilitating rapid color formation, because the second enzyme is silent and noninteractive with the assay until the first reaction product turns it on.

Another approach to enzyme activation, termed prosthetic group label immunoassay (PGLIA), allows the ELA to be carried out in a homogeneous format in which no washing steps are required. The advantage of this approach is that no separation steps are required for the assay.

An exemplary immunoassay that may be used for quantifying levels of PGE<sub>2</sub> in the practice of the method of the invention is the High Sensitivity PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay # 93001 from Assay Designs, Inc. of Ann Arbor, MI.

Exemplary instrumental analytic techniques useful in the practice of the invention include gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), high performance liquid chromatography, (HPLC), thin layer chromatography (TLC) and the like, as well as colorimetric or spectroscopic methods. An exemplary colorimetric method useful in the practice of the invention is the total protein assay using bicinchoninic acid (BCA) (Kit #23225, Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

#### EXAMPLES

The advantages of the invention and specific embodiments of the method and kit of present invention are illustrated by the following examples. It will be understood, however, that the invention is not confined to the specific limitations set forth in the individual examples, but rather, is defined within the scope of the appended claims.

In the examples described below, levels of PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$  and protein were determined using Assay Designs, Inc. Immunoassay kit #93001, Endogen, Inc. Immunoassay kit EH2-

IL1A and the Pierce BCA Protein Assay Reagent kit, respectively. A summary of these assays is provided below:

Assay Designs, Inc. PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay:

The analyses are conducted in the supplied Goat anti-Mouse IgG 96-well microtiter plate.

A series of eight PGE<sub>2</sub> standard solutions is prepared by serial dilution of a standard solution containing 50,000 pg/mL PGE<sub>2</sub>. The eight standard solutions contain 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, and 7.81 pg/mL PGE<sub>2</sub>, respectively.

100  $\mu$ L of assay buffer are pipetted into the non-specific binding (NSB) and B<sub>0</sub> (0 pg/mL) wells.

100  $\mu$ L of each of the PGE<sub>2</sub> standards is pipetted into the appropriate wells.

100  $\mu$ L of each of the samples is pipetted into the appropriate wells.

50  $\mu$ L of assay buffer is pipetted into the NSB wells.

50  $\mu$ L of blue conjugate (a blue solution of alkaline phosphatase conjugated with PGE<sub>2</sub>) is pipetted into each well except for the total activity (TA) and blank wells.

50  $\mu$ L of yellow antibody (a yellow solution of a monoclonal antibody to PGE<sub>2</sub>) is pipetted into each well except for the blank, TA, and NSB wells.

The plate, covered with the provided plate sealer, is incubated overnight (18 to 24 hours) at 4°C.

The wells are emptied and are washed by adding 200 $\mu$ L of wash solution to each well. The washes are repeated two more times for a total of three washes. After the final wash, the wells are emptied and the plate is firmly tapped on a lint-free paper towel to remove any remaining wash buffer.

5  $\mu$ L of blue conjugate is added to the TA wells.

200  $\mu$ L of p-NPP (p-nitrophenyl phosphate) substrate solution is added to each well.

The plate is covered and is incubated at 37°C for one hour without shaking.

50  $\mu$ L of stop solution (trisodium phosphate) is added to each well. The plates are read immediately after the stop solution is added.

The plate is blanked in the plate reader against the blank wells. The optical density of the wells is read at 405 nm, preferably with correction between 570 and 590 nm.

The calculation of the concentration of PGE<sub>2</sub> in the samples is preferably conducted with by an immunoassay software package utilizing a 4-parameter logistic curve fitting program such as "AssayZap" sold by Biosoft (Ferguson, MO). Alternatively, the concentration of PGE<sub>2</sub> may be calculated as follows:

The average net optical density (OD) bound for each standard and sample is calculated by subtracting the average NSB OD from the average OD bound.

$$\text{Average Net OD} = \text{Average Bound OD} - \text{Average NSB OD}$$

The binding of each pair of standard wells as a percentage of the maximum binding wells (B<sub>0</sub>) is calculated using the following formula:

$$\text{Percent Bound} = \frac{\text{Net OD}}{\text{Net } B_0 \text{ OD}} \times 100$$

The percent bound vs. concentration of PGE<sub>2</sub> for the standards is plotted using logit-log paper. The concentration of PGE<sub>2</sub> in the unknowns may be determined by interpolation.

A typical standard curve of percent bound vs. PGE<sub>2</sub> concentration is shown in Fig. 1.

#### Endogen, Inc. Interleukin-1 $\alpha$ ELISA

The assay is performed in the provided anti-human IL-1 $\alpha$  pre-coated stripwell plate.

For the preparation of the calibration curve, standards are prepared by serial dilution having IL-1 $\alpha$  concentrations of 400, 160, 64, 25.6, 10.24, 6.12, 3.06 and 0 pg/mL.

50  $\mu$ L of each standard and sample are added in duplicate to test wells. The plate is covered with an adhesive plate cover and is incubated for one hour at room temperature, 20 to 25°C.

50  $\mu$ L of biotinylated antibody reagent is added to each of the wells. The plate is covered with an adhesive plate cover and is again incubated for one hour at room temperature.

At the end of the incubation period, the plate cover is carefully removed and the plate is washed three times with wash buffer. After the third wash is removed, the plates are patted onto paper towels or other absorbent material.

100  $\mu$ L of streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) is added to each of the wells. A new adhesive plate cover is attached, and the plate is incubated for 30 minutes at room temperature.

At the end of the incubation period, the plate cover is removed and the wells are washed three times with wash buffer. The plates are then patted onto paper towels or other absorbent material.

100  $\mu\text{L}$  of 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride (TMB) substrate solution is added to each well. The plate is allowed to react with the substrate for 30 minutes in the dark at room temperature. After 30 minutes, the reaction is stopped by the addition of 100  $\mu\text{L}$  of stop solution to each well.

Within thirty minutes of stopping the reaction, the plate is read on a plate reader set at 450 and 550 nm. The reading at 550 nm is subtracted from the reading at 450 nm. Reading at the dual wavelengths corrects for optical imperfections in the microtiter plate.

The standard curve is used to determine the amount of IL-1 $\alpha$  in an unknown sample. The standard curve is determined by plotting the average absorbance (450-550 nm) obtained for each of the standards vs. the IL-1 $\alpha$  concentration. A typical plot is shown in Fig. 2. An unknown is determined manually using graph paper or with a curve-fitting statistical software package to plot a four-parameter logistic curve. The amount of IL-1 $\alpha$  in each sample is determined by interpolating from the absorbance value to the IL-1 $\alpha$  concentration using the standard curve.

#### Protein Assay with Pierce BCA Reagent

The Pierce BCA protein assay combines the well-known reduction of  $\text{Cu}^{+2}$  to  $\text{Cu}^{+1}$  by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous ion using a reagent containing bicinchoninic acid. The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. The water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562 nm that is linear over a broad working range of protein concentrations.

The BCA protein assay consists of two BCA reagents and an albumin standard. BCA reagent A contains sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartarate in sodium hydroxide solution. BCA reagent B contains 4% cupric sulfate. The BCA working reagent (WR) is prepared by mixing 50 parts of BCA Reagent A with one part of BCA Reagent B. The WR is stable for several days in a closed container at room temperature.

The albumin standard contains Bovine Serum Albumin (BSA) at a concentration of 2.0 mg/mL (2,000  $\mu$ g/mL) in 0.9% saline and 0.05% sodium azide. The standard may be diluted with diluent to prepare standards down to a concentration of 5  $\mu$ g/mL.

25  $\mu$ L of each standard and unknown are pipetted into the appropriate microwell plate wells. 25  $\mu$ L of diluent is used for the blank wells.

200  $\mu$ L of WR is added to each well. The plate is mixed well with a plate shaker for 30 seconds. The plate is covered and incubated at 37°C for 30 minutes. The plate is then cooled to room temperature and the absorbance of each well is read on a plate reader at 562 nm.

The average 562 nm absorbance of the blank is subtracted from the reading of all other individual standards and unknown samples. A standard curve is prepared by plotting the average blank-corrected reading for each of the standards vs. its concentration in  $\mu$ g/mL. The standard curve is used to determine the protein concentration of each of the unknown samples. Alternatively, curve-fitting software referred to hereinabove may be used for unknown quantitation.

**EXAMPLE 1 – Method of Measuring the Irritation Effect of Water on the Skin**

As a means to determine the sensitivity of the method to measure sub-clinical effects, two mild fluids were chosen to determine their inflammatory potential after product exposure. Some of the mildest fluids that could be envisioned would be different types of water, present during skin cleansing, as well as a major component in many topical skin care products. In this example, we measured the inflammatory response of the skin using PGE<sub>2</sub> as a marker after exposure of the skin to deionized water and tap water.

The following method was followed:

1. Baseline (corresponding to an untreated control) levels of PGE<sub>2</sub> contained in secretions present on the skin surface were measured along the lower volar forearms of test panelists by placing a mild adhesive-coated microporous plastic film, Sebutape® (Cuderm Corporation, Dallas, Texas), on the skin with the adhesive side down, making direct contact with the skin. The Sebutape® was removed from the skin after 1 minute and then placed in a vial containing 500 µL saline. This Sebutape® collection process was repeated three more times with a 1-minute contact time for each Sebutape®. The collected samples were stored at -70 °C until analysis (described below).
2. Hill Top chambers® (Hill Top Research, Cincinnati, Ohio) containing 400 µL of the test fluid (deionized or tap water) were applied to the lower volar forearms of the test panelists. After 4 hours of exposure, the Hill Top chambers® were removed and the test sites were rinsed with tap water and patted dry.
3. Twenty four hours after the Hill Top chambers® were removed and the arm was rinsed and patted dry, skin secretions containing PGE<sub>2</sub> expressed on the skin surface were collected using the Sebutape absorption method described previously in Step #1 above. While the inflammatory mediators may be collected at any time after exposure

of the test product or process to the skin, it is preferable to measure the levels of PGE<sub>2</sub> expressed on the skin approximately 24 hours after exposure, as a study of the kinetics of PGE<sub>2</sub> expression revealed that the levels of PGE<sub>2</sub> were highest 24 hours after exposure versus after shorter times.

The collected Sebutape® samples were analyzed using the following methods. After thawing, the samples were sonicated for 15 minutes and vortexed vigorously. The solutions, containing extracted proteins and eicosanoids, were analyzed for levels of PGE<sub>2</sub> via immunoassay (Assay Designs High Sensitivity PGE<sub>2</sub> Enzyme Immunoassay # 93001) and levels of total protein using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Kit #23225, Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

Four Sebutape® samples were taken from each test site. The measured levels of PGE<sub>2</sub> (in pg/mL) were normalized against the total amount of protein (in µg/mL) extracted from each Sebutape® strip. The four normalized values were then averaged to determine the levels of PGE<sub>2</sub> (in pg/µg) expressed for each test site. To account for person-to-person variability, PGE<sub>2</sub> levels for each panelist were further normalized relative to the levels of PGE<sub>2</sub> measured for the untreated control.

The level of irritation elicited by tap water compared to that of deionized water using the method described above is shown in Table 1.

Table 1 - Normalized levels of PGE<sub>2</sub> (dimensionless units)

Panelist	Deionized Water	Tap Water
1	0.40	0.52
2	0.56	0.85
3	0.62	0.89
4	0.69	0.72
5	0.92	1.41
6	0.84	1.51
7	0.93	1.40
8	1.71	1.45
9	1.01	2.33
10	0.94	2.08
Average	0.86	1.32

As shown in Table 1, the method is able to differentiate between the levels of inflammation or irritation elicited by different types of water tap water causes approximately 35% more of the inflammatory mediator PGE<sub>2</sub> to be expressed on the skin surface than deionized water.

**EXAMPLE 2 - Possible Interactions of Anionic Surfactants with Interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ )**

One of the concerns of using IL-1 $\alpha$  as a marker of inflammation or irritation is its potential interaction with surfactants often contained in topical skin care compositions. This example illustrates this interaction as measured by the apparent levels of IL-1 $\alpha$  expressed on the skin as a function of the concentration of sodium lauryl sulfate (SLS, Stepan Co., Northfield, IL) in a test fluid.

The level of irritation caused by dilute solutions of SLS as a function of SLS concentration was assessed using the method described in Example 1, with the exception that the level of Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) was used to assess the degree of irritation, rather than PGE<sub>2</sub>. The levels of IL-1 $\alpha$  were measured via immunoassay (Human IL-1 $\alpha$  Kit #EH2-IL1 $\alpha$ ,

Endogen, Inc., Woburn, MA). As with PGE<sub>2</sub>, the measured levels of IL-1 $\alpha$  (in pg/mL) were normalized against the total amount of protein (in  $\mu$ g/mL) extracted from each Sebupape® strip. To account for person-to-person variability, IL-1 $\alpha$  levels for each treatment site were further normalized using the baseline levels of IL-1 $\alpha$  measured for the untreated control. The data are shown below in Table 2.

Table 2 - Normalized levels of IL-1 $\alpha$  (dimensionless units)

Concentration of SLS in Deionized Water (w/w %)	Levels of IL-1 $\alpha$ (dimensionless units)
0	1.35
5	2.83
10	2.71
20	1.00

Table 2 shows the dose dependent data of IL-1 $\alpha$  after exposure of the skin to various concentrations of SLS. The amount of the inflammatory marker or response is expected to increase as the level of the anionic surfactant, SLS, increases. While this is observed at low SLS levels, this is not seen at the highest concentration of SLS tested in the study, raising a potential issue as to the robustness of the method. While wishing not to be bound by theory, it is thought that high concentrations of anionic surfactants, such as SLS, may interact with proteins, such as IL-1 $\alpha$ , causing denaturation of the proteins. This process would affect the immunoassays, and could result in the lower apparent levels of IL-1 $\alpha$  that are observed in this experiment at the highest SLS concentration. When analyzing for levels of IL-1 $\alpha$  using immunoassays, the SLS may change the conformation of the protein, rendering it unrecognizable by the antibody used in the assay. Thus, using the levels of IL-1 $\alpha$  to assess the degree of irritation is limited due to these potential surfactant-protein interactions.

### EXAMPLE 3 - Inflammation due to a Mild Facial Cleanser

The method of Example 1 was extended to measure the level of inflammation or irritation elicited by a dilute solution (8% w/w in deionized water) of a mild facial cleanser

(Neutrogena Fresh Foaming Cleanser, Neutrogena Corporation, Los Angeles, California)  
compared to that of deionized water.

The ingredients of the cleanser composition are listed in Table 3.

Table 3 - Composition of the mild facial cleanser

Purified Water
Glycerin
Lauryl Glucoside
Decyl Glucoside
Cocamidopropyl Betaine
Cocamide DEA
Glycereth-7
Ammonium Laureth Sulfate
Sodium Cocoyl Sarcosinate
Glycol Stearate
PEG-120 Methyl Glucose Dioleate
Tetrasodium EDTA
DMDM Hydantoin
Citric Acid
Fragrance

The level of irritation elicited by the facial cleanser compared to that of deionized water as indicated by expressed levels of PGE<sub>2</sub> using the methods described above is shown in Table 4.

Table 4 - Normalized levels of PGE2 (dimensionless units)

Panelist	Deionized Water	Facial Cleanser
1	1.98	1.81
2	1.48	1.26
3	1.30	0.67
4	0.83	2.11
5	1.49	1.72
6	2.12	3.07
7	1.25	2.38
8	1.60	3.03
9	1.77	3.05
10	1.45	0.85
Average	1.53	2.00

The results in Table 4 show that the inflammation response of these mild products can be differentiated using the aforementioned methodology. Exposure of the skin to this mild facial cleanser results in greater inflammation or irritation than deionized water; however, the level of irritation caused by the mild cleanser is only about 24% greater than that caused by deionized water alone.

It is important to realize that the numerical irritation results cited here are not absolute; rather, they were obtained for a particular population of panelists at a particular time of year. It is known that different people will exhibit different inflammatory responses upon exposure to the same topical skin care product. In addition, it is also known that insults to the stratum corneum during warmer, more humid times of the year (*i.e.*, summer) will have a lesser effect than during colder, dryer times of the year (*i.e.*, winter). Thus, it is important not to cross-compare the actual values measured for each of the different studies unless these variables are taken into account.

**EXAMPLE 4 - Exposure to External Aggressions**

The method of the invention may also be extended to external aggressions, for instance, to test the irritation provided by an applicator for a topical skin care product. In this example, the level of inflammation or irritation caused by scrubbing with a baby washcloth (Gerber® Baby Washcloth) was compared to the level of irritation caused by using a regular washcloth (St.Mary's® - Division of Fieldcrest Cannon, Inc.).

The methods used to assess inflammation or irritation were similar to the method of Example 1, with the exception that instead of using a Hill Top Chamber® to apply the irritant to the arm, the following scrubbing protocol was used. Each washcloth (Baby Cotton Washcloth vs. Regular Cotton Washcloth) was saturated with an 8% (w/w) dilution of Johnson's® Head-to-Toe™ Baby Wash (Johnson & Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey, ingredients list shown in Table 5) in tap water. Each site on the volar forearm was scrubbed for 2 minutes. After washing, the arm was rinsed with water and patted dry. PGE<sub>2</sub> levels were analyzed and are reported in Table 6.

Table 5 - Composition of the baby wash

Water
PEG-80 Sorbitan Laurate
Sodium Laureth Sulfate
Cocamidopropyl Betaine
PEG-150 Distearate
Sodium Lauroampho PG-Acetate Phosphate
Glycerine
Polyquaternium-10
Fragrance
Quaternium-15
Tetrasodium EDTA

Table 6 - Normalized levels of PGE2 (dimensionless units)

Panelist	Baby Washcloth	Regular washcloth
1	0.84	1.31
2	1.08	0.88
3	1.13	1.19
4	1.02	1.08
5	0.87	1.29
6	1.35	0.89
7	1.17	0.92
8	0.70	1.13
9	1.17	1.29
10	0.57	1.10
Average	0.99	1.11

As seen in Table 6, the method of the invention is useful to distinguish between levels of inflammation or irritation caused by exposure to an external aggression. The method of the invention indicates a directional difference between scrubbing with the baby washcloth versus the regular washcloth; scrubbing with a baby washcloth causing less irritation than scrubbing with the regular washcloth.

#### EXAMPLE 5 - External Aggressions in Conjunction with Topical Skin Care Products

The method of the invention may be applied to a comparison of different topical skin care products with the concomitant exposure to an external aggression. In this example, scrubbing with a dilute solution of a baby bath was compared to scrubbing with tap water alone. The baby bath was a 10% (w/w) dilution of Johnson's® Head-to-Toe™ Baby Wash (Johnson & Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey, ingredient list shown previously in Table 5) in tap water.

Inflammation or irritation was assessed as described in Example 1, with the exception that rather than using a Hill Top Chamber®, 2 mL of water or 2 mL of a dilute solution of a baby bath were used to wash the volar forearm using a Dia-stron® Wash Simulator

(cyberDERM Inc., Media, Pennsylvania). Each site was scrubbed for 2 minutes. After scrubbing, the arm was rinsed with water and patted dry. PGE<sub>2</sub> results are listed in Table 7.

Table 7 - Normalized Levels of PGE<sub>2</sub> (Dimensionless units)

Panelist	Scrubbing with Tap Water	Scrubbing with Baby Bath
1	0.68	0.62
2	0.76	0.62
3	1.22	0.50
4	1.28	0.30
5	1.29	0.67
6	0.90	0.65
7	0.47	0.44
8	1.40	0.66
9	0.21	0.11
10	0.11	0.17
Average	0.83	0.47

As demonstrated in Table 7, the method of the invention may be used to test the relative irritation of topical skin care products during concomitant exposure to an external aggression. Washing with tap water alone is shown to cause more irritation than washing with the mild baby bath.

**EXAMPLE 6 - Evaluation of External Aggressions via Levels of IL-1 $\alpha$**

Previous examples have demonstrated the ability of PGE<sub>2</sub> to distinguish between the levels of inflammation or irritation due to exposure to a topical skin care product or exposure to an external aggression. In addition, previous work has shown a correlation between cytokine levels, for example IL-1 $\alpha$ , and the amount of inflammation caused by sodium lauryl sulfate application, as well as the use of cytokines to characterize severe disease conditions. In this example, we show how the method of the invention, may be applied to monitoring the levels of IL-1 $\alpha$  as a measure of the level of inflammation or irritation caused by external aggressions, for instance the method of applying the topical skin care product to the skin. In

this example, the level of inflammation or irritation caused by scrubbing with a baby washcloth is compared to the level of irritation when using a regular washcloth.

The relative irritation caused by the two applicators was assessed using the method of Example 1 with the exception that the following scrubbing protocol was used in place of the Hill Top Chamber®. Each washcloth (Baby Cotton Washcloth – Gerber® Baby Washcloth, Regular Cotton Washcloth – St.Mary's® - Division of Fieldcrest Cannon, Inc.) was saturated with an 8% (w/w) dilution of Johnson's® Head-to-Toe™ Baby Wash (Johnson & Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey, ingredients listed previously in Table 5) in tap water. Each site on the volar forearm was scrubbed for 2 minutes. After washing, the arm was rinsed with water and patted dry. Also contrary to Example 1, IL-1 $\alpha$  levels were monitored as a measure of the level of inflammation or irritation, rather than PGE2. The levels of IL-1 $\alpha$  were measured via immunoassay (Endogen Human IL-1alpha Kit #EH2-IL1a), and these values are reported in Table 8.

Table 8 - Normalized Levels of IL-1 $\alpha$  (dimensionless units)

Panclist	Baby Washcloth	Regular Washcloth
1	0.73	0.52
2	1.59	0.79
3	0.97	1.44
4	0.92	1.78
5	0.50	0.46
6	0.42	0.36
7	0.27	1.00
8	1.54	1.96
9	1.23	2.62
Average	0.91	1.22

As seen in Table 8, measurements of IL-1 $\alpha$  can be used to distinguish between levels of inflammation or irritation caused by exposure to an external aggression such as scrubbing with different types of cloths. Scrubbing with a baby washcloth causes less irritation than scrubbing with a regular washcloth.

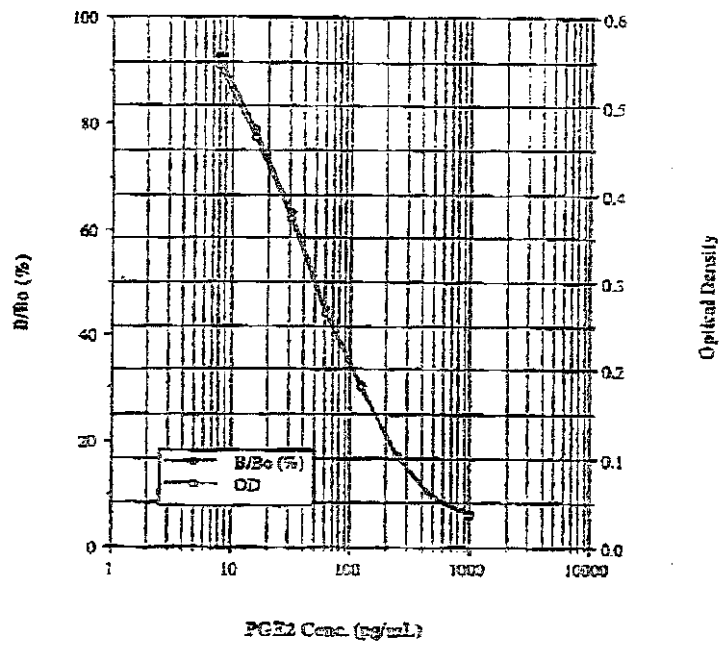
In addition, a more complete indication of inflammation or irritation caused by exposure to a topical skin care product and/or to an external aggression can be obtained by monitoring the levels of IL-1 $\alpha$  in conjunction with PGE<sub>2</sub>. Combining the results shown previously for PGE<sub>2</sub> in Example 4 with this example provides a more comprehensive understanding of the effects of scrubbing with different types of cloth on inflammation, since we are measuring primary pro-inflammatory mediators of the cytokine pathway as well as the arachidonic acid pathway.

4. Preferred aspects are provided as stated in the followings
- (1) The method of claim 1, wherein said non-invasive collection device is a device selected from the group consisting of uncoated non-porous plastic film, an uncoated microporous plastic film, an adhesive-coated nonporous plastic film, an adhesive-coated microporous plastic film, a woven fibrous web, a non-woven fibrous web, a natural sponge, a synthetic sponge and a plastic foam.
  - (2) The method of aspect(1), wherein said non-invasive collection device is an adhesive-coated microporous plastic film.
  - (3) The method of claim 1, wherein said eicosanoid is prostaglandin.
  - (4) The method of aspect(3), wherein said prostaglandin is prostaglandin E<sub>2</sub>.
  - (5) The method of claim 1, wherein the level of eicosanoid is analyzed using at least one immunoassay technique selected from the group consisting of RIA, EIA and ELISA.
  - (6) The method of claim 1, wherein the level of eicosanoid is analyzed using analytical techniques selected from the group consisting of GC/MS, HPLC, and TLC.
  - (7) The method of claim 1, further comprising the step of analyzing the level of at least one cytokine in the secretions collected from the surface of said skin by said device.
  - (8) The method of aspect(7), wherein said cytokine is interleukin-1 $\alpha$ .
  - (9) A method of aspect(7), wherein said cytokine is interleukin-1 $\alpha$  and said eicosanoid is prostaglandin E<sub>2</sub>.
  - (10) The method of claim 2, wherein said non-invasive collection procedure comprises using a non-invasive collection device, said noninvasive collection device selected from the group consisting of an uncoated non-porous plastic film, an uncoated microporous plastic film, an adhesive-coated nonporous plastic film, an adhesive-coated microporous plastic film, a woven fibrous web, a non-woven fibrous web, a natural sponge, a synthetic sponge and a plastic foam.

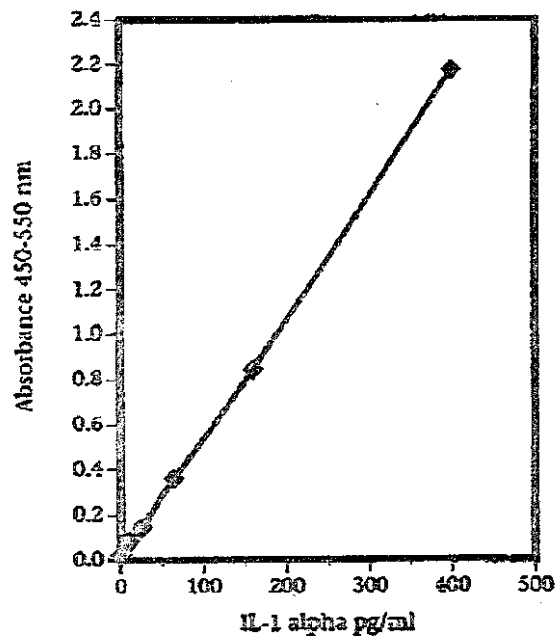
- (11) The method of aspect(10), wherein said non-invasive collection device comprises an adhesive-coated microporous plastic film.
- (12) The method of claim 2, wherein said eicosanoid is prostaglandin.
- (13) The method of aspect(12), wherein said prostaglandin is prostaglandin E<sub>2</sub>.
- (14) The method of claim 2, wherein the level of eicosanoid is measured using at least one immunoassay technique selected from the group consisting of RIA, EIA, and ELISA.
- (15) The method of claim 2, wherein the level of eicosanoid is measured using analytical techniques selected from the group consisting of GC/MS, HPLC, and TLC.
- (16) The method of claim 2, further comprising the step of measuring the level of at least one cytokine in the secretions collected from the surface of said skin by said device before and after step (c).
- (17) The method of aspect(16), wherein said cytokine is interleukin-1 $\alpha$ .
- (18) A method according to aspect(16), wherein said cytokine is interleukin-1 $\alpha$  and said eicosanoid is prostaglandin E<sub>2</sub>.
- (19) A method according to claim 2, wherein step (d) is performed about 24 hours after step (c).
- (20) The method of claim 2, further comprising the step of:  
measuring the level of protein in the skin secretions and normalizing the level of eicosanoid to the level of protein.

- (21) The kit of claim 3, wherein said non-invasive collection device is a device selected from the group consisting of an uncoated non-porous plastic film, an uncoated microporous plastic film, an adhesive-coated non-porous plastic film, an adhesive-coated microporous plastic film, a woven fibrous web, a non-woven fibrous web, a natural sponge, a synthetic sponge and a plastic foam.
- (22) The kit of aspect(21), wherein said non-invasive collection device comprises an adhesive-coated microporous plastic film.
- (23) The kit of claim 3, wherein said immunoassay is selected from the group consisting of RIA, EIA and ELISA.
- (24) The kit of claim 3, wherein said immunoassay is an ELISA.
- (25) The kit of claim 3, wherein said eicosanoid is prostaglandin.
- (26) The kit of aspect(25), wherein said prostaglandin is prostaglandin E<sub>2</sub>.
- (27) The kit of claim 3, wherein said immunoassay comprises an antibody for said eicosanoid and a multi-well plate for conducting said immunoassay.
- (28) The kit of aspect(27), wherein said immunoassay further comprises an enzyme conjugated with said eicosanoid or with said antibody.
- (29) The kit of claim 28, further comprising a substrate for said enzyme.
- (30) The kit of claim 3, further comprising an immunoassay for further measuring levels of a cytokine in said secretions.
- (31) The kit of aspect(30), wherein said cytokine is interleukin-1 $\alpha$ .
- (32) The kit of aspect(30), wherein said eicosanoid is prostaglandin E<sub>2</sub> and said cytokine is interleukin-1 $\alpha$ .
- (33) The kit of claim 3 wherein said kit is used to measure the sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian skin due to exposure of said skin to at least one topical skin care product, exposure to at least one external aggression or combinations thereof.

[ 図 1 ]



【図2】



A non-invasive, *in vivo* method for measuring sub-clinical or clinical inflammation or irritation of mammalian skin from exposure of the skin to a topical skin care product, exposure to an external aggression or combinations thereof is disclosed. In one embodiment, the method includes the steps of collecting eicosanoid from the skin using a non-invasive collection device and analyzing levels of eicosanoid collected from the skin. A kit for measuring a marker of skin irritation or inflammation is also disclosed. The kit includes a non-invasive collection device for collecting secretions from the skin surface, and an immunoassay for measuring level of eicosanoid in the secretions.

## 2. Representative Drawing

Fig.1

专利名称(译)	用于测量皮肤的炎性或刺激性反应性的方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003329674A</a>	公开(公告)日	2003-11-19
申请号	JP2003060238	申请日	2003-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	庄臣及庄臣视力保护公司		
申请(专利权)人(译)	强生消费品公司		
[标]发明人	ケリー・ヒュアング ニーナ・ティアニー ベンジャミン・ウィーガンド		
发明人	ケリー・ヒュアング ニーナ・ティアニー ベンジャミン・ウィーガンド		
IPC分类号	G01N33/50 A61B5/00 A61B5/107 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/88		
CPC分类号	G01N33/88 G01N33/6893 G01N2800/20 Y10T442/2525		
FI分类号	G01N33/50.Q A61B5/00.M G01N33/48.S G01N33/53.F G01N33/88 A61B5/10.300.Q A61B5/107.800		
F-TERM分类号	2G045/BA20 2G045/BB41 2G045/CB09 2G045/DA36 2G045/DA59 2G045/FB03 4C038/VA04 4C038/VB22 4C038/VC20 4C117/XA01 4C117/XA02 4C117/XB01 4C117/XD05 4C117/XE03 4C117/XJ11		
优先权	10/091813 2002-03-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种非侵入性的测量方法和试剂盒，用于测量局部护肤产品的非重叠或明显的炎性反应性或刺激性反应性，而无需长时间对消费者进行测试。一种非侵入性的方法，用于测量由于哺乳动物皮肤暴露于局部皮肤护理产品，外部侵害或其组合而引起的皮肤的亚临床或明显的炎性或刺激性反应性。公开了体内方法。在一实施例中，该方法包括使用非侵入性收集装置从皮肤收集类花生酸并分析从皮肤收集的类花生酸的水平。还公开了用于测量皮肤刺激性或炎性反应性标志物的试剂盒。该试剂盒具有用于收集皮肤表面分泌物的收集装置和用于测量分泌物中类二十烷酸水平的免疫测定装置。

