

明 細 書

発明の名称： 紫外線感受性の判定方法

技術分野

[0001] 本発明はヒト皮膚の紫外線感受性を判定する紫外線感受性の判定方法、及び紫外線感受性低減剤の評価又は選択方法に関する。

背景技術

[0002] 皮膚は、太陽光曝露により様々なダメージを受けている。特に紫外線領域（290～400nm）の光により皮膚内に生じる活性酸素種（ROS）やROSとの反応により生成する生体酸化物は、酸化ストレスとして皮膚に有害な作用を及ぼし、短期間の曝露により引き起こされる紅斑や色素沈着形成、さらには長期間の曝露で引き起こされる光老化や発癌などに深く関与していることが知られている（非特許文献1，2）。

[0003] この紫外線による障害から皮膚を防御する技術として、サンスクリーン剤や抗酸化剤などを皮膚に塗布し、紫外線照射によるROSや生体酸化物の産生を抑制して酸化ストレスを予防する方法がある。

一方、生体は紫外線照射等の外部刺激による酸化ストレスに対し、活性酸素種の消去システムや生体内抗酸化物質等の対抗手段を有している。しかし、これらの対抗手段は、年齢、遺伝的要因、生活習慣、食習慣等による個人差があり、個人毎に紫外線に対する予防ケアの必要性が異なってくる。そのため紫外線に対する有効な予防ケアをするには、紫外線照射等が皮膚に及ぼす酸化ストレスや皮膚内の抗酸化力を的確に評価することが必要である。

[0004] ヒト皮膚の酸化ストレスを評価する方法としては、生検皮膚を用いた方法が存在するが侵襲的であるために汎用されるには至っていない。角層テープストリッピングによる酸化タンパク質の評価は低侵襲的ではあるが、角層のみの評価に留まり、皮膚内部の状態を反映しているとは言い難い（非特許文献3）。非侵襲的な評価方法として、ラマン分光法による皮膚中カロテノイド測定の実績が報告が存在するが、単一の抗酸化物質の評価であり、これもまた皮

膚全体の応答を反映しているとはいえない（非特許文献4）。

また、紫外線照射による酸化ストレスの感受性を直接的に評価する方法として、紫外線照射24時間後に紅斑を形成させる最少の紫外線量（MED；Minimal Erythema Dose）を測定し、紫外線による紅斑のできやすさの指標とすることができるが、紫外線照射24時間後の紅斑形成を判定するため簡便な方法とはいえない。

[0005] そのような中、非侵襲的に生体の酸化状態を評価できる技術として、生体微弱発光（バイオフィトン）の検出技術が注目されている。バイオフィトンとは、生物が生命活動に伴って放射している極めて弱い自発的発光である。その由来として、一重項酸素や励起カルボニル化合物類が推察されており、生体の酸化反応に起因した発光と考えられている。

バイオフィトンは、植物、微生物、動物など様々な生物で観測され、ヒト皮膚においては、特に紫外線A波（UVA）を照射した後のバイオフィトンが計測されており、皮膚色の違いにより発光強度が異なること（非特許文献5）、抗酸化クリーム塗布により発光が低減されることが報告されている（非特許文献6）。

しかしこれらの報告は、UVA照射直後から数分間の積算値で評価しており、刻々と変化する酸化ストレス応答の詳細を経時的に評価しておらず、バイオフィトンがどのような挙動を示すかについて明らかにした報告も存在しない。

[0006] （非特許文献1）Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 18, 75-81（2002）

（非特許文献2）Toxicology 189, 21-39（2003）

（非特許文献3）Skin Res. Technol. 13, 84-90（2007）

（非特許文献4）J. Invest. Dermatol. 115, 441-48（2000）

（非特許文献5）Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 25, 65-70（2009）

（非特許文献6）Skin Pharmacol. Physiol. 24, 300-4（2011）

発明の概要

[0007] 本発明は、以下の１）及び２）に係るものである。

１）被験者の皮膚に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオトンの量を用いて紫外線感受性を判定する工程を含む紫外線感受性の判定方法であって、該所定期間は、その５０％以上が照射後１～３分の期間と重なる期間である、方法。

２）試験物質を被検対象に投与又は接触させる工程、及び被検対象の皮膚又は皮膚細胞に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオトンの量を用いて試験物質を評価する工程を含む紫外線感受性低減剤の評価又は探索方法であって、該所定期間は、その５０％以上が照射後１～３分の期間と重なる期間である、方法。

図面の簡単な説明

[0008] [図１]紫外線照射後のバイオフィトン量の推移を示す図。

[図２]ローズマリー水溶液連続塗布後の応答バイオフィトン量を示す図。

発明の詳細な説明

[0009] 本発明は、紫外線に対する感受性を非侵襲的に即判定する方法、及び紫外線感受性低減剤を評価・探索する方法を提供することに関する。

[0010] 本発明者らは、紫外線による皮膚のダメージを早期に評価し得る方法について検討した結果、ヒト皮膚に紫外線を照射してから所定時間内に検出されるバイオフィトンが、翌日に発症する紅斑形成に深く関与し、当該バイオフィトンの量を指標として、紫外線に対する感受性の評価や、紫外線感受性を低減させる素材の評価・探索ができることを見出した。

[0011] 本発明によれば、紫外線に対する感受性を非侵襲的に即判定でき、紫外線による紅斑形成を未然に防止するための対策、具体的には紫外線の物理的な防御やサンスクリーン等の紫外線防御用皮膚外用剤の塗布等の対策に役立てることができる。また、本発明によれば、紫外線感受性低減剤を簡易且つ効率よく評価又は探索することができる。

[0012] 本発明の紫外線感受性の判定方法では、被験者の皮膚に紫外線を照射し、

該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィトン量が指標として用いられる。

また、本発明の紫外線感受性低減剤の評価又は探索方法では、試験物質を被検対象の皮膚又は皮膚細胞に投与又は接触させ、被検対象の皮膚又は皮膚細胞に紫外線を照射した場合の、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィトン量が指標として用いられる。

本発明の方法において、照射する紫外線としては、紫外領域に波長を有する光線であれば特に限定されず、具体的には波長が285～320nmのUV-B波、または320～400nmのUV-A波が挙げられる。本発明ではA波とB波の混合紫外線が好ましく、光の強度の割合（A波／B波）が6～20であるのが好ましく、7～15であるのがより好ましく、8～12であるのが更に好ましい。

[0013] 照射する紫外線の強度は特に限定されないが、例えば、好ましくは10mW/cm²以上、より好ましくは20mW/cm²以上、より好ましくは30mW/cm²以上であり、且つ好ましくは200mW/cm²以下、より好ましくは170mW/cm²以下、より好ましくは150mW/cm²以下である。また、好ましくは10～200mW/cm²、より好ましくは20～170mW/cm²、より好ましくは30～150mW/cm²である。なお、本発明において紫外線の強度とは、UV-B波とUV-A波を合わせた波長領域（285～400nm）の紫外線の強度を意味する。

紫外線の強度は、市販されている計測器を用いて計測することが可能であり、Solarmeter Model 5.0 (UVA+B) (Solartech Inc.)、多目的分光放射計MSR-7000N（オプトリサーチ社）などが挙げられる。

[0014] また、照射時間は、照射する紫外線の強度によって異なるが、例えば5～300秒間が挙げられ、好ましくは5～240秒間、更に好ましくは5～200秒間である。

[0015] 照射紫外線強度と照射時間により決定される紫外線照射量（照射エネルギー）としては、好ましくは300～8000mJ/cm²であり、より好まし

くは500～7000 mJ / cm²、さらに好ましくは600～6000 mJ / cm²である。

[0016] 紫外線を照射するための紫外線照射装置は、上述した波長範囲の光を発することが可能な光源を備えていれば特に限定されず、光源としては、例えば、低圧水銀灯、高圧水銀灯、超高圧水銀灯、キセノンランプ、メタルハイドランプ、ウッドランプ、蛍光検査灯等が挙げられ、好ましくはキセノンランプである。

斯かる光源に、必要に応じて、紫外線領域の波長の光を選択できるフィルターを組み合わせることにより、照射波長が調節される。

[0017] 紫外線照射が行われる被験者の皮膚部位としては、紫外線照射やバイオフィトン測定が可能な部位であれば特に限定されないが、生活紫外線に晒される可能性の高い部位は、日々の紫外線照射の影響により紫外線感受性が変動し、本発明の方法における測定値のバラツキの原因となるおそれがあるため、生活紫外線を受けにくい部位が好ましい。具体的には、前腕内側部、上腕内側部、背部、臀部、腹部等の皮膚が挙げられ、前腕内側部、上腕内側部、背部、臀部が好ましく、前腕内側部又は腹部がより好ましい。

[0018] また、本発明の紫外線感受性の評価又は選択方法における被検対象としては、ヒト（被験者）の他に、培養表皮細胞や3D皮膚モデルや培養皮膚組織等が含まれ、紫外線照射は、上記と同様の被験者の皮膚部位、又は培養表皮細胞や皮膚培養組織における当該細胞又は組織（皮膚）に対して行われる。培養表皮細胞としては、好ましくは表皮角化細胞（ケラチノサイト）が挙げられ、3次元培養皮膚細胞としては、EpiDerm™（MatTek Corporation社製）、EpiSkin（SkinEthic社製）、RHE（SkinEthic社製）、Labcyteエピモデル（J-TEC社製）等の市販品が使用できる。

[0019] 後記試験例1に示すとおり、皮膚に紫外線照射した場合に発生するバイオフィトンは、紫外線照射直後に最大の発光強度を示し、その後発光は経時的に減衰する。そして本発明により、照射後主として1～3分の期間における発光強度と、紫外線照射24時間後において観察される紅斑形成が相関する

ことが見出された（試験例２及び３）。

よって、本発明の紫外線感受性の判定方法、又は紫外線感受性低減剤の評価又は探索方法においては、紫外線照射後１～３分の期間と、その５０％以上が当該期間と重なる期間を所定期間とし、当該所定期間のバイオフィトン量が判定又は評価に用いられる。

[0020] 所定期間は、その５０％以上が上記照射後１～３分の期間と重なる期間として設定されるが、好ましくは７０％以上、より好ましくは８０％以上、より好ましくは９０％以上が照射後１～３分の期間と重なるように設定するのが好ましく、その１００％が重なる、照射後１～３分内の期間であるのがより好ましい。

ここで、所定期間と照射後１～３分の期間が重なるとは、両期間に共通の期間が存在することを意味し、その５０％以上が重なるとは所定期間の５０％以上が照射後１～３分の期間と重なることを意味する。

[0021] また、紫外線照射直後の初期期間はバイオフィトン量が多く、本発明の判定又は評価に及ぼす影響が大きいことから、本発明の所定期間は、紫外線照射直後の初期期間と重ならないように設定するのが好ましい。具体的には、照射終了後から１５秒まで、好ましくは３０秒まで、より好ましくは４５秒までの初期期間と重ならないように設定するのが好ましい。

[0022] 所定期間の長さは、有効な量のバイオフィトンを測定する観点から、好ましくは３０秒間～３分間、より好ましくは４０秒間～２分間、より好ましくは５０秒間～１分３０秒間、より好ましくは１分間である。

[0023] より好適な所定期間としては、例えば照射後１～２分の１分間、照射後２～３分の１分間、照射後１～３分の２分間が挙げられる。

[0024] バイオフィトンの検出は、極微弱なバイオフィトンの検出が可能な高感度で低ノイズのＣＣＤ等の検出部を備えた光学検出装置によって行われる。光学検出装置としては、例えば、微弱発光強度検出装置（ＣＬＡ－ＩＤＦｓｋ、東北電子産業社製）を用いることができる。検出される放射光の波長は検出装置の光電子増倍管により異なるが、前記装置では３００～８５０ｎｍの

バイオフィトンが検出される。また、バイオフィトンの測定は、測定環境に由来する光の影響を極力抑えるため、可能な限り遮光された空間で実施されるのが好ましく、例えば暗室にて実施される。

すなわち、暗室にて、前記の紫外線照射装置を用いて測定部位に紫外線を照射し、次に微弱発光強度検出装置により紫外線照射部位から発するバイオフィトンを測定するのが好ましい。また、紫外線照射装置における紫外線放射部と微弱発光強度検出装置における検出部は別々であっても良いが、紫外線照射とバイオフィトンの検出が装置を付け替えることなく行えるという観点から、紫外線放射部（具体的には紫外線照射装置から伸びている光照射用のファイバー）と検出部を一体とし、光路の切り替えによって使用する装置が替えられる構造となっていることが好ましい。

[0025] 紫外線照射により発生したバイオフィトンは、予め紫外線照射前の安静時の発光強度（「定常バイオフィトン」とも称す）を測定しておき、続いて紫外線照射後の所定期間内における発光強度（「照射後バイオフィトン」とも称す）を測定し、その値から安静時発光強度を引いた値を発光増分（「応答バイオフィトン」とも称す）として算出できる。

[0026] 上記のとおり、紫外線照射後24時間後に観察される紅斑の程度は、紫外線照射後1～3分の期間に検出されるバイオフィトンの量と正の相関を示す。従って、該バイオフィトン量は、紫外線に対する感受性を判定するため、或いは紫外線感受性低減剤を評価又は探索するための指標として利用することが可能である。ここで、「紫外線に対する感受性」とは、紫外線により惹起される紅斑などの炎症性の反応の強弱や持続時間によって示される炎症性反応の程度を指し、その炎症性反応の程度が紫外線に対する感受性を意味する。また、「紫外線感受性の低減」とは、当該紫外線に対する感受性を緩和又は抑制し、紫外線により惹起される紅斑などの炎症性反応の発症を抑制することを意味する。

[0027] 本発明の紫外線感受性の判定方法においては、例えば、年齢若しくは年代毎、又は性別毎に予め本発明における紫外線照射後の一定期間に検出される

バイオフィオンの量を測定して、基礎データとして取得しておき、それらから算出された平均値と標準偏差から、被験者の年齢（年代）、性別における偏差値を計算して、紫外線に対する感受性判定の指標とすることができる。

または、感受性が高い（赤くなり易い）、やや感受性が高い（やや赤くなり易い）、標準、やや感受性が低い（やや赤くなりにくい）、感受性が低い（赤くなりにくい）等の紫外線に対する感受性の判定指標に関し、それらと偏差値範囲を関係づける適当な評価基準を作成し、それに基づいて被験者の偏差値から紫外線に対する被験者の感受性を判定することもできる。

[0028] 上記による紫外線感受性の判定方法は、従来のMED測定と比較すると非常に短時間で判定可能で、被験者への負担も少ない。本発明の判定方法により得られた紫外線感受性に関する情報は、紫外線に対する物理的な防御対策やサンスクリーン等の紫外線防御用皮膚外用剤の塗布による紫外線対策に、紫外線防御用皮膚外用剤の購入時における製品選択や紫外線防御用皮膚外用剤の推奨販売における製品推奨の指標として、役立てることができる。

本発明の紫外線感受性の判定方法は、所謂人間の身体の各器官の構造又は機能を計測する等して人体から各種の資料を収集するための方法に該当し、上記の目的で使用される。すなわち、医療目的で人間の病状や健康状態等の身体状態又は精神状態を判断するものではない。斯かる意味において、本発明の紫外線感受性の判定方法は、紫外線感受性の測定方法或いは紫外線感受性の検査方法とも表記し得る。

[0029] 本発明の紫外線感受性低減剤の評価又は探索は、試験物質を被検対象に投与又は接触させる工程を含み、被検対象の皮膚又は皮膚細胞に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオンの量を用いて試験物質の評価が行われる。

ここで、投与される試験物質としては、特に制限されず、天然に存在する物質であっても、化学的又は生物学的方法等で人工的に合成した物質であってもよく、また化合物であっても、組成物若しくは混合物であってもよい。但し、安全性が確保された既知の物質、例えば医薬品、化粧品、及びそれら

の原料として使用されている物質や組成物であることが好ましい。尚、試験物質が医薬品や化粧品等の組成物である場合、該組成物が紫外線吸収剤や紫外線散乱剤等の紫外線防御素材を含有していると、本評価又は探索法における紫外線照射において、被検対象の皮膚又は皮膚細胞に照射される紫外線が物理的に防御されてしまうため、検出されるバイオフィトン量に影響を及ぼすおそれがある。従って、本評価又は探索法において試験物質が組成物である場合、該組成物は、紫外線吸収剤や紫外線散乱剤等の紫外線防御素材を含有していない組成物であることが好ましい。または、本評価又は探索法において試験物質として紫外線防御素材を含有する組成物を評価する場合、バイオフィトン測定前又は紫外線照射前に該組成物を被検対象の皮膚又は皮膚細胞から除く処理を行うことが好ましい。

[0030] 試験物質の投与形態は、経口又は非経口投与のいずれでも良いが、非経口投与の形態であるのが好ましく、具体的には、軟膏、クリーム、乳液、ローション、ジェル、エアゾール、パッチ、テープ、スプレー等の種々の形態で皮膚に塗布する形態が好ましい。

また、試験物質を被検対象へ投与又は接触させる回数は特に限定されない。また、紫外線照射と同時又は直前の単回投与又は接触であっても良いが、紫外線照射前に所定の投与又は接触期間を設け、その期間内において所定の投与又は接触頻度で1回又は複数回投与若しくは接触するのが好ましい。被検対象がヒトである場合、投与期間としては、1日以上が好ましく、1週間以上がより好ましく、4週間以上がさらに好ましい。また6ヶ月以下が好ましく、3ヶ月以下がより好ましく、2ヶ月以下がさらに好ましい。投与頻度は、1日当たり1回以上が好ましく、1回～5回がより好ましく、1回～3回がさらに好ましく、2回がさらに好ましい。

被検対象として培養表皮細胞や3D皮膚モデルや培養皮膚組織等を用いる場合、接触期間は1時間以上が好ましく、6時間以上がより好ましく、24時間以上がさらに好ましい。また72時間以下が好ましく、36時間以下がより好ましく、48時間以下がさらに好ましい。接触頻度は前記接触期間

中 1 回以上が好ましく、1 ～ 4 回がより好ましく、1 又は 2 回がさらに好ましい。

[0031] そして、紫外線照射後の所定期間内に検出されるバイオフィトンが測定され、バイオフィトン量を低下させる試験物質が、紫外線感受性低減剤として評価される。

バイオフィトン量を低下させる試験物質の同定は、例えば、異なる濃度の試験物質を投与した場合に測定されるバイオフィトン量を比較することによって行うことができる。より具体的な例としては、より高濃度の試験物質投与群とより低濃度の試験物質投与群との間；試験物質投与群とプラセボ投与群との間；試験物質投与群と無投与群との間；又は試験物質投与前後で、バイオフィトン量を比較する。試験物質の投与により、又はより高濃度の試験物質の投与によりバイオフィトン量が低下する場合、当該試験物質をバイオフィトン量低下物質として同定することができる。

例えば、試験物質投与群におけるバイオフィトン量が対照群（プラセボ投与群又は無投与群）と比較して低下傾向が認められた場合、好ましくは統計学的に有意な低下が認められた場合、当該試験物質をバイオフィトン量低下物質として同定することができる。

そして、同定されたバイオフィトン量を低下させる試験物質は、紫外線感受性低減剤として評価することができる。

[0032] このようにして選択された紫外線感受性低減剤は、例えば、紫外線感受性を低減するための皮膚外用剤として使用すること、或いは紫外線感受性を低減するための素材又は製剤として皮膚外用剤に配合して使用することができる。

[0033] 上述した実施形態に関し、本発明においてはさらに以下の態様が開示される。

< 1 > 被験者の皮膚に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィトンの量を用いて紫外線感受性を判定する工程を含む紫外線感受性の判定方法であって、該所定期間は、その 50 % 以上が照射後 1 ～ 3 分の

期間と重なる期間である、方法。

<2>所定期間の長さが、30秒間～3分間、より好ましくは40秒間～2分間、より好ましくは50秒間～1分30秒間、より好ましくは1分間である<1>の方法。

<3>所定期間が、紫外線照射後1～2分の1分間、紫外線照射後2～3分の1分間、又は紫外線照射後1～3分の2分間である<1>又は<2>の方法。

<4>紫外線照射が、A波とB波の混合紫外線の照射である<1>～<3>のいずれかの方法。

<5>紫外線照射が、 $300 \sim 8000 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ であり、より好ましくは $500 \sim 7000 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 、さらに好ましくは $600 \sim 6000 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の紫外線照射量である<1>～<4>のいずれかの方法。

<6>バイオフィオンの発光強度によりバイオフィオンの量を算出する<1>～<5>のいずれかの方法。

<7>紫外線感受性が、紫外線による紅斑形成である<1>～<6>のいずれかの方法。

<8> 試験物質を被検対象に投与又は接触させる工程、及び被検対象の皮膚又は皮膚細胞に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオンの量を用いて試験物質を評価する工程を含む紫外線感受性低減剤の評価又は探索方法であって、該所定期間は、その50%以上が照射後1～3分の期間と重なる期間である、方法。

<9>被検対象が、ヒト、培養表皮細胞、3D皮膚モデル又は培養皮膚組織である、<8>の方法。

<10>試験物質の被検対象への投与又は接触が、紫外線照射前に所定の投与又は接触期間を設け、その期間内において所定の投与又は接触頻度で1回又は複数回投与若しくは接触させる、<8>又は<9>の方法。

<11>試験物質の被験者への投与が、投与期間として、好ましくは1日以上、より好ましくは1週間以上、より好ましくは4週間以上で、且つ好まし

くは6ヶ月以下、より好ましくは3ヶ月以下、より好ましくは2ヶ月以下であり、投与頻度として、好ましくは1日当たり1回以上、より好ましくは1回～5回、より好ましくは1回～3回、より好ましくは2回である、＜10＞の方法。

＜12＞試験物質の培養表皮細胞、3D皮膚モデル又は培養皮膚組織への接触が、接触期間として、好ましくは1時間以上、より好ましくは6時間以上、より好ましくは24時間以上で、且つ好ましくは72時間以下、より好ましくは36時間以下、より好ましくは48時間以下であり、接触頻度として、前記接触期間中好ましくは1回以上、より好ましくは1～4回、より好ましくは1又は2回である、＜10＞の方法。

実施例

[0034] 紫外線照射装置

光源としてキセノンランプを備えた300W型のキセノン光源（MAX-301、朝日分光社製）に、WG-320フィルター（厚さ1mm、渋谷光学社製）を取り付けて使用した（紫外線A波（UVA）：紫外線B波（UVB）＝10.8：1）。

[0035] 試験例1 ヒトにおける紫外線照射による微弱発光

被験者は30歳代健常男性1名で、暗室中にて10分間馴化した後に測定を行った。測定には微弱発光強度検出装置（CLA-IDFs k、東北電子産業社製）を用い、安静座位にて装置の検出部アタッチメントと前腕内側とを密着させた。なお該検出部アタッチメントには紫外線照射装置からの光照射用ファイバーが繋がって一体となっており、光路を切り替えることで紫外線照射と微弱発光強度検出が替えられる構造となっている。部位を変えて紫外線照射を行い（紫外線強度は15.4、32.5又は61.6mW/cm²、照射時間120秒間、紫外線照射量は、それぞれ1.8、3.9又は7.4J/cm²）、それぞれ照射終了2秒後からの発光強度を10分間計測した。

計測の結果を図1に示す。紫外線照射による皮膚からのバイオフィトン量

は、紫外線照射直後に最大となった後、急速に減少し、ある程度減少した後
は時間経過とともに徐々に減衰していくことが確認された。

[0036] 試験例 2 ヒトにおける微弱発光計測と紅斑評価 (1)

紫外線照射と微弱発光強度検出は、試験例 1 と同じ装置を用い、同じ手順
にて行った。被験者は 20～30 歳代健常男性 3 名とし、安静座位にて装置
の検出部アタッチメントと前腕内側とを密着させた。紫外線照射前に、安静
時の発光強度を 3 分間計測した。続いて、紫外線照射を行い、照射終了 2 秒
後からの発光強度を 10 分間計測した。各時間区分の発光の平均値から安静
時発光を引いた値を、紫外線照射による発光増分として算出した。紫外線照
射とその後の微弱発光計測は、照射部位を変えて複数の紫外線照射条件で行
った。具体的な照射条件と計測結果については表 1 に記載した。

また、紫外線照射部位における紅斑形成は、照射 24 時間後に高速分光光
度計 (CMS-35FS、村上色彩技術研究所製) を用いて皮膚色を測定し
、照射部位と照射部位近傍の非照射部位との赤みの差分 (Δa^*) として評
価し、その結果を表 1 に記載した。

表 1 の結果から、 Δa^* と紫外線照射による発光増分との相関係数 (R)
を算出した (表 2)。

[0037]

[表1]

照射線量 (mW/cm2)	Subject#1						Subject#2						Subject#3					
	50	100	150	300	450	750	60	120	180	240	300	360	60	120	180	240	300	360
照射時間 (sec)	15	30	45	75	112.5	175	15	30	45	75	112.5	175	15	30	45	75	112.5	175
照射強度 - (mJ/cm2)	750	1500	2250	4500	6750	10125	900	1800	2700	3600	4500	5400	900	1800	2700	3600	4500	5400
発光増分	Ave 2-10s	4541.7	4518.7	4824.0	5717.4	3311.1	3016.9	4494.8	6613.8	5259.6	3285.8	3189.9	3568.1	5064.9	5258.8			
	Ave 11-60s	309.3	347.2	274.5	334.9	278.3	267.2	346.3	333.9	288.4	216.7	257.4	294.0	291.2	213.8			
	Ave 1-2min	61.3	80.9	49.5	77.1	53.3	55.0	70.3	54.8	54.9	38.1	53.5	70.7	56.9	35.0			
	Ave 2-3min	31.3	31.5	17.5	34.6	17.7	23.7	27.6	25.7	25.4	18.4	19.0	26.9	31.7	16.2			
	Ave 3-4min	20.4	22.4	14.8	17.2	17.9	14.7	20.9	16.7	16.4	10.9	16.2	22.9	15.8	4.0			
Ave 4-5min	7.0	19.6	7.4	14.6	9.2	9.2	4.6	10.3	12.5	8.4	4.5	16.2	16.0	12.7	3.0			
Δa*	0.89	1.76	-0.19	3.83	0.30	1.12	3.27	1.19	1.91	0.21	0.07	5.30	4.74	1.10				

[表2]

各時間の平均発光増分と Δa^* との相関係数	
時間	相関係数
2～10秒	0.218
11～60秒	0.439
1～2分	0.580*
2～3分	0.680**
3～4分	0.403
4～5分	0.450

* ; $p < 0.05$ 、** ; $p < 0.01$

[0039] 試験例3 ヒトにおける微弱発光計測と紅斑評価（2）

紫外線照射と微弱発光強度検出は、試験例1と同じ装置を用い、同じ手順にて行った。被験者は20～30歳代健常男性10名とし、安静座位にて装置の検出部アタッチメントと上腕内側とを密着させた。紫外線照射前に、安静時の発光強度を3分間計測した。続いて、紫外線照射を行い、照射終了2秒後からの発光強度を5分間計測した。各時間区分の発光の平均値から安静時発光を引いた値を、紫外線照射による発光増分として算出した。紫外線照射とその後の微弱発光計測は、照射部位を変えて複数の紫外線照射条件で行った。具体的な照射条件と計測結果については表3に記載した。

また、紫外線照射部位における紅斑形成は、試験例2と同様に、赤みの差分（ Δa^* ）として評価し、その結果を表3に記載した。

表3の結果から、 Δa^* と紫外線照射による発光増分との相関係数（R）を算出した（表4）。

[0040]

[表3]

	照射線量 (mW/cm ²)	照射時間 (sec)	照射エネルギー (mJ/cm ²)	発光増分					Δa^*
				Ave 0-1min	Ave 1-2min	Ave 2-3min	Ave 3-4min	Ave 4-5min	
Sub#1	37.5	30	1125	1482.4	75.8	39.5	21.0	21.3	-0.15
	75	15	1125	1945.7	68.5	31.2	18.2	12.7	0.24
	75	30	2250	2319.3	75.2	34.6	21.4	12.5	4.69
	112.5	30	3375	3861.3	120.7	53.3	32.6	26.9	6.46
Sub#2	37.5	30	1125	2049.7	84.8	41.9	17.4	9.0	0.56
	75	15	1125	2505.3	81.0	39.8	21.0	14.4	1.00
	75	30	2250	2497.8	102.8	51.2	30.7	19.4	1.49
	112.5	30	3375	3503.4	110.0	51.9	34.9	21.4	4.81
Sub#3	37.5	30	1125	2165.4	77.2	31.3	17.3	11.6	-0.19
	75	15	1125	2969.4	66.8	31.1	17.9	3.4	0.03
	75	30	2250	3887.9	72.3	33.7	19.2	13.0	1.40
	112.5	30	3375	4211.1	99.8	46.9	27.8	13.6	1.97
Sub#4	37.5	30	1125	2223.0	66.2	28.9	18.5	17.0	0.80
	75	15	1125	2918.4	79.9	35.0	22.7	12.7	0.98
	75	30	2250	2786.7	84.4	41.8	29.9	15.1	1.17
	112.5	30	3375	4305.2	110.8	48.2	26.8	19.5	7.03
Sub#5	37.5	30	1125	2205.0	88.1	36.9	21.0	18.1	1.30
	75	15	1125	3174.3	84.3	36.1	19.9	9.7	0.66
	75	30	2250	3326.0	89.7	35.2	20.1	11.0	2.76
	112.5	30	3375	4397.1	96.8	43.3	19.7	13.4	6.72
Sub#6	37.5	30	1125	2519.7	85.6	33.7	23.8	15.4	0.10
	75	15	1125	3721.4	80.8	36.6	13.1	17.5	0.49
	75	30	2250	3511.1	92.7	46.6	30.8	20.7	0.47
	112.5	30	3375	3736.2	90.0	36.8	23.1	15.0	2.21
Sub#7	37.5	30	1125	1816.0	67.7	23.6	15.9	6.4	0.44
	75	15	1125	2399.4	73.1	31.2	17.1	10.1	1.13
	75	30	2250	2640.3	78.8	35.2	21.7	15.2	1.48
	112.5	30	3375	3659.8	112.2	50.6	23.7	17.7	4.98
Sub#8	37.5	30	1125	2001.2	74.9	35.3	22.6	13.1	-0.32
	75	15	1125	2751.7	70.2	34.7	21.3	16.8	0.35
	75	30	2250	2887.8	95.0	43.4	25.9	21.7	2.39
	112.5	30	3375	3600.1	85.2	39.1	26.8	13.1	8.34
Sub#9	37.5	30	1125	2173.3	67.3	27.5	15.1	6.3	0.50
	75	15	1125	4074.8	84.4	34.9	20.0	12.3	0.21
	75	30	2250	3078.4	86.4	36.3	16.2	6.7	1.82
	112.5	30	3375	4441.5	99.3	53.1	33.3	15.5	5.55
Sub#10	37.5	30	1125	4630.7	103.1	44.8	22.8	15.9	0.12
	75	15	1125	4034.8	95.3	43.7	26.9	12.7	-0.11
	75	30	2250	3745.7	98.5	43.6	16.9	15.8	1.77
	112.5	30	3375	5303.1	109.4	47.2	37.4	16.7	2.00

[0041] [表4]

各時間の平均発光増分と Δa^* との相関係数	
時間	相関係数
0～1分	0.449
1～2分	0.563**
2～3分	0.525**
3～4分	0.423
4～5分	0.326

** ; $p < 0.01$

[0042] 表2、表4に示されるように、紫外線照射後1～2分と2～3分の期間に検出されるバイオフィトン（応答バイオフィトン）の量は、紫外線照射後の紅斑形成の程度と有意な正の相関関係を有することが分かる。

従って、紫外線照射後主として1～3分の期間に検出されるバイオフィトンの量を指標として、紫外線による紅斑形成に代表される炎症性の反応に関する感受性を判定することができる。

[0043] 試験例4 紫外線感受性低減剤の評価

1) 被験者：健常な成人日本人男性10名

[0044] 2) 試験品： 3. 0% (v/v) * ファルコレックス ローズマリー E
水溶液

1. 0% (v/v) * ファルコレックス ローズマリー E
水溶液

プラセボ水溶液

*試験品である水溶液中におけるファルコレックス ローズマリー E（一丸ファルコス株式会社製）の濃度

[0045] 3) 応答バイオフィトン測定及び解析：

応答バイオフィトンについては、下記に示す定常バイオフィトンと照射後バイオフィトンを測定し、光照射終了後1～3分の期間の照射後バイオフィトン測定値から定常バイオフィトン測定値を減算することで算出した。統計解析は一元配置分散分析及びBonferroniの多重比較により有意差検定を実施した。

<定常バイオフィトン>

微弱発光強度検出装置（CLA-IDFs k、東北電子産業社製）を用いて、紫外線照射前における各被験部位における微弱発光を1分間計測した。

<照射後バイオフィトン>

試験例1と同じ紫外線照射装置を用いて1430mJ/cm²の紫外光（太陽光と同等の波長域）を被験部位に照射し、微弱発光強度検出装置を用いて、紫外線照射直後から3分までの各被験部位の微弱発光を計測した。

[0046] 4) 試験手順：

腹部をウェットティッシュにて清拭し、被験部位として3ヶ所のマーキングを行った。被験部位は5 cm 四方 (5 × 5 cm) とした。暗室にて10分間の馴化後、バイオフィトン計測を行った。測定日の夕方から、上記試験品を1日2回 (朝、夕) 4週間、被験部位3ヶ所にそれぞれ2 mg / cm² 塗布してもらった。連用後、連用前と同様の手順でバイオフィトン計測を行った。

[0047] 5) 結果

連用後の応答バイオフィトン値を図2に示す。プラセボと比較した結果、ローズマリー3.0%水溶液で有意に低下した。尚、ローズマリーは、その抽出物の事前塗布により紫外線照射による紅斑形成を抑制することが公知である (特開2002-87975号公報)。

[0048] 試験例5 紫外線感受性低減剤の評価 (培養細胞を用いた評価)

1) 細胞：正常ヒト新生児包皮由来表皮角化細胞 (凍結HEKn、Life Technologies)

(培養条件)

増殖添加剤 (HuMedia-KG、クラボウ) を含む表皮角化細胞用増殖培地 (Epi Life、Life Technologies) 中、37℃、5%CO₂の条件下で常法に従って培養した。微弱発光測定には、Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS、Invitrogen) で洗浄してから細胞を回収した後、HBSSに4×10⁶ cells/mlとなるように懸濁させた細胞懸濁液を供した。

[0049] 2) 試験品：T r o l o x (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Aldrich)

[0050] 3) 応答バイオフィトンの測定：

応答バイオフィトンについては、下記に示す定常バイオフィトンと照射後バイオフィトンを測定し、光照射終了後2～3分の期間の照射後バイオフィトン測定値から定常バイオフィトン測定値を減算することで算出した。尚、バイオフィトン測定及び紫外線照射は、ディッシュの蓋を外した条件下にて

行った。

<定常バイオフィトン>

細胞懸濁液 1.0 ml を 35 mm ディッシュにとり、微弱発光強度検出装置 (CLA-1DFsk、東北電子産業社製) を用いて暗室中にて紫外線照射前の発光強度を 3 分間測定した。

<照射後バイオフィトン>

試験例 1 と同じ紫外線照射装置を用いて、太陽紫外光シミュレーター光 (125 mW/cm^2) を 40 秒間照射し、照射後の発光強度を 5 分間計測した。

[0051] 4) 試験方法

70～80%コンフルエント状態の正常ヒト表皮角化細胞に、Trolox (終濃度 $100 \mu\text{M}$) 若しくは対照溶媒 (70% エタノール) を添加した。24 時間後に細胞を回収し、上述の方法に基づき、応答バイオフィトンの測定を行った。測定データは、対照溶媒群の値を 1 として相対的に評価した。

[0052] 5) 結果

表 5 に示すように、対照溶媒群に比較して、ビタミン E の水溶性アナログであり抗酸化剤として知られている Trolox 添加群にて応答バイオフィトン強度の抑制傾向が認められた ($p < 0.1$: 対応のない t 検定、両側)。

[0053] [表5]

	対照溶媒	Trolox 添加
応答バイオフィトン強度 (平均値±標準偏差)	1.000 ± 0.216	$0.722 \pm 0.170 \dagger$

($\dagger$: $p < 0.1$)

[0054] 試験例 6 紫外線感受性低減剤の評価 (組織培養皮膚を用いた評価)

1) 皮膚組織: 米国スキンバンク National Disease Research Interchange (

NDRI) から、外科手術由来の正常ヒト皮膚組織を購入した。なお、組織提供機関において、皮膚組織を研究用途で使用するに対する同意が書面で所得されている。

(培養条件)

ヒト皮膚組織は、皮下脂肪をトリミングした後に、ナイフで約 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ の大きさに小片化し、6穴プレートを使用して 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ の条件下で培養した。培養には、Fetal Bovine Serum (FBS) を $10\% \text{ (v/v)}$ 含む Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium (いずれも Life Technologies) を使用した。

培養1日後の皮膚をバイオフィトン測定に供した。

2) 試験品: Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)

3) 応答バイオフィトンの測定:

応答バイオフィトンについては、下記に示す定常バイオフィトンと照射後バイオフィトン測定し、光照射終了後1～3分の期間の照射後バイオフィトン測定値から定常バイオフィトン測定値を減算することで算出した。尚、バイオフィトン測定及び紫外線照射は、皮膚組織を培養液から取り出した条件下にて行った。

<定常バイオフィトン>

微弱発光強度検出装置 (CLA-IDS k、東北電子産業社製) を用いて暗室中にて太陽紫外光シミュレーター光照射前の発光強度を3分間測定した。

<照射後バイオフィトン>

試験例1と同じ紫外線照射装置を用いて、太陽紫外光シミュレーター光 (30 mW/cm^2) を3分20秒間照射し、照射後の発光強度を5分間計測した。

4) 試験方法

培養1日後の培養ヒト皮膚組織に、Trolox (終濃度 $100\text{ }\mu\text{M}$) 若

しくは対照溶媒（70%エタノール）を培地中に添加し、24時間後に皮膚組織をPBSで洗浄した後、上述の方法に基づき、応答バイオフィオンの計測を行った。測定データは、対照溶媒群の値を1として相対的に評価した。

5) 結果

表6に示すように、対照溶媒群に比較してTrolox添加群にて応答バイオフィオン強度の有意な抑制が認められた（ $p < 0.05$ ：対応のないt検定、両側）。

[0055] [表6]

	対照溶媒	Trolox 添加
応答バイオフィオン強度 (平均値±標準偏差)	1.000±0.182	0.634±0.143 *

(*: $p < 0.05$)

請求の範囲

- [請求項1] 被験者の皮膚に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオトンの量を用いて紫外線感受性を判定する工程を含む紫外線感受性の判定方法であって、該所定期間は、その50%以上が照射後1～3分の期間と重なる期間である、方法。
- [請求項2] 所定期間の長さが、30秒間～3分間である請求項1記載の方法。
- [請求項3] 所定期間が、紫外線照射後1～2分の1分間、紫外線照射後2～3分の1分間、又は紫外線照射後1～3分の2分間である請求項1又は2記載の方法。
- [請求項4] 紫外線照射が、A波とB波の混合紫外線の照射である請求項1～3のいずれか1項記載の方法。
- [請求項5] 紫外線照射が、 $300\sim8000\text{ mJ/cm}^2$ の紫外線照射量である請求項1～4のいずれか1項記載の方法。
- [請求項6] バイオフィオトンの発光強度によりバイオフィオトンの量を算出する請求項1～5のいずれか1項記載の方法。
- [請求項7] 紫外線感受性が、紫外線による紅斑形成である請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
- [請求項8] 試験物質を被検対象に投与又は接触させる工程、及び被検対象の皮膚又は皮膚細胞に紫外線を照射し、該照射後の所定期間内に検出されるバイオフィオトンの量を用いて試験物質を評価する工程を含む紫外線感受性低減剤の評価又は探索方法であって、該所定期間は、その50%以上が照射後1～3分の期間と重なる期間である、方法。