

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6320833号
(P6320833)

(45) 発行日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日(2018.4.13)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/04 (2006.01) C 1 2 Q 1/04 Z N A
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 1 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2014-87005 (P2014-87005)	(73) 特許権者	592262543
(22) 出願日	平成26年4月21日 (2014.4.21)		日本メナード化粧品株式会社
(65) 公開番号	特開2015-204780 (P2015-204780A)		愛知県名古屋市西区鳥見町2丁目130番地
(43) 公開日	平成27年11月19日 (2015.11.19)	(72) 発明者	村上 祐子
審査請求日	平成29年2月21日 (2017.2.21)		名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	足立 浩章
			名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	山羽 宏行
			名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		審査官	福間 信子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 美白成分のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

線維芽細胞に過酸化水素と試料を添加し、過酸化水素による神経栄養因子 neureglin 1 (NRG1) の産生上昇に対する試料の抑制作用を、NRG1の産生抑制効果を指標として評価することを特徴とする美白成分のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、線維芽細胞を用いることを特徴とする美白成分のスクリーニング方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

一般に、シミ、ソバカス、日焼け等にみられる皮膚の色素沈着は、ホルモンの異常や紫外線の刺激により、皮膚内に存在するメラニン色素生成細胞(メラノサイト)がメラニン色素を過剰に生成し、これが皮膚内に沈着することが原因と考えられている。このような色素沈着を防ぐ方法の一つに、メラニンの過剰な生成を抑制する方法が知られている。そして従来から、メラニンの過剰な生成を抑制する目的で、アルブチン、ハイドロキノン、コウジ酸、トラネキサム酸及びこれらの誘導体等が用いられてきた。

【0003】

neuregulin 1 (NRG1) は、中枢神経系において、神経細胞やグリア細胞

の増殖、分化を調節している神経栄養因子であるが、近年、真皮の線維芽細胞において、その発現がみられること、又、メラノサイトに作用してメラニン生成を引き起こすことが分かってきた（非特許文献1及び2）。

【0004】

美白成分のスクリーニング方法としては、B16マウスメラノーマを用いたメラニン生成抑制試験によるスクリーニング方法（特許文献1）、メラノサイト内でのメラノソーム構造タンパク質gp100を指標とするスクリーニング方法（特許文献2）、アドレノメジュリン結合受容体を介するシグナル伝達系への不活性化作用を指標とするスクリーニング方法（特許文献3）等が既に知られている。しかしながら、これらは全て表皮に存在するケラチノサイトやメラノサイトが指標であった。

10

【0005】

最近の研究から、皮膚色が濃いほど真皮中のNRG1の発現が高いことが明らかとなり、表皮以外の因子がメラニン生成に関与していることが分かってきた（非特許文献1及び2）。ところが、今までに、真皮に存在する線維芽細胞から産生される因子を指標とする美白成分のスクリーニング方法は開発されていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2008-280249

【特許文献2】特開2008-232693

【特許文献3】特開2012-255710

20

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】J. Cell Sci., 123 (Pt 18), 3102-3111 (2010)

【非特許文献2】Pigment Cell. Melanoma Res., 25 (4), 477-481 (2012)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで、本発明は、優れた美白成分の発見に繋がる新規の技術を確立することを課題とする。特に、ケラチノサイトやメラノサイトを用いる既知の作用機序に基づいた美白作用を利用するだけでは、優れた美白成分を発見することは困難であると考えられる。即ち、本発明は、新規の作用機序に基づいた美白作用を評価し得る方法を確立することを課題とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題の解決に向け鋭意検討を行った結果、神経栄養因子NRG1を指標にし、表皮に存在するケラチノサイトやメラノサイトではなく、真皮に存在する線維芽細胞に着目した新規の美白成分のスクリーニング方法を完成するに至った。NRG1は、真皮由来のメラニン生成促進因子であると考えられ、メラノサイトにおけるメラニンの過剰な生成を抑制するには、この真皮由来メラニン生成促進因子の制御も重要である。更に、かかる方法により評価し、選択した成分を含有した組成物が、色素沈着の予防又は改善効果を発揮することを確認した。

40

【0010】

即ち、本発明は以下の(1)~(5)から成る。

【0011】

(1) 線維芽細胞を用いることを特徴とする美白成分のスクリーニング方法。

(2) 線維芽細胞における神経栄養因子の産生量を指標とする(1)記載の方法。

(3) 神経栄養因子がneureglin1(NRG1)であることを特徴とする(2)

50

記載の方法。

(4) 神経栄養因子の産生抑制効果を指標とする(2)又は(3)記載の方法。

(5) 予め酸化ストレスを負荷した線維芽細胞を用いることを特徴とする(1)~(4)のいずれか一項記載の方法。

【0012】

本発明によれば、線維芽細胞における神経栄養因子NRG1を指標とすることにより、化粧品や皮膚外用剤等に用いる美白成分の評価又はスクリーニングが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ヒト皮膚線維芽細胞におけるNRG1タンパク質の免疫染色の図である。一つの紡錘形が一つの細胞である。

10

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明における美白成分のスクリーニング方法とは、美白効果のある成分を選抜する方法である。本発明の方法によりスクリーニングされた美白成分は、化粧品又は皮膚外用剤等に配合及び調製することができる。

【0015】

本発明における神経栄養因子とは、神経細胞へ栄養を送り届け、神経の機能維持や成長等の要因となっている因子のことである。代表的なものとして、neuregulin、neurotrophin、brain-derived neurotrophic factor、nerve growth factor、ciliary neurotrophic factor等が挙げられる。好ましくは、neuregulinである。

20

【0016】

本発明におけるneuregulin(NRG)とは神経細胞の軸索成長因子であり、神経やグリアの増殖・転移・運命決定に重要な役割を果たしている。今までのところ、NRGのサブタイプとしてNRG1、2、3及び4が知られている。最近の研究から、NRG1は神経系だけではなく皮膚の線維芽細胞にも発現しており、皮膚色が濃いほどその発現が高く、NRG1タンパク質をメラノサイトに作用させるとメラニン生成に影響を及ぼすことが報告されている。

30

【0017】

本発明における神経栄養因子の産生抑制効果とは、真皮に存在する線維芽細胞にて産生される神経栄養因子NRG1を指標とし、何らかの成分によりその産生を抑制する効果のことである。この目的のために、NRG1を測定する必要がある。この測定に用いられる方法は特に限定されず、何れかの方法を用いることができる。代表的なものとして、リアルタイムRT-PCR法によりNRG1 mRNA発現量の測定を行う方法、ウェスタンブロッティング法によりNRG1タンパク質量の測定を行う方法、ELISA法によりNRG1タンパク質量の測定を行う方法等が挙げられる。好ましくは、リアルタイムRT-PCR法によりNRG1 mRNA発現量の測定を行う方法である。

【0018】

40

本発明における酸化ストレスとは、酸化反応により引き起こされる生体にとって有害な作用のことである。細胞を用いた試験においては、紫外線、活性酸素、過酸化脂質等で曝露することにより酸化ストレスを負荷する手法が用いられている。好ましくは、過酸化水素(H₂O₂)を用いた手法である。

【0019】

次に、本発明を詳細に説明するため、具体的な実施例を挙げて説明する。これらの実施例は効果を具体的に説明するもので、発明の範囲を限定するものではない。実施例中の配合量は重量%である。

【実施例】

【0020】

50

スクリーニング対象薬剤として、月下美人抽出物を使用した。月下美人とは、サボテン科クジャクサボテンの原種 (*Epiphyllum oxypetalum* Haw.) 及びその近縁種であり、その園芸品種の全草や花の乾燥物等を利用することができる。

【0021】

月下美人の製造例として、下記の抽出を行うことができる。

【0022】

製造例1 月下美人抽出物

月下美人の花の乾燥物100gに精製水3Lを加え、95～100℃で2時間抽出した。濾過した後、濾液を減圧濃縮し、更に凍結乾燥して月下美人抽出物48gを得た。

【0023】

スクリーニング対象薬剤として用いる月下美人抽出物は、処方例として下記の製剤化を行うことができる。

【0024】

処方例1 クリーム

処方

	配合量 (%)	
1. 月下美人抽出物 (製造例1)	0.1	
2. スクワラン	5.5	
3. オリーブ油	3.0	
4. ステアリン酸	2.0	
5. ミツロウ	2.0	20
6. ミリスチン酸オクチルドデシル	3.5	
7. ポリオキシエチレンセチルエーテル (20E.O.)	3.0	
8. ベヘニルアルコール	1.5	
9. モノステアリン酸グリセリン	2.5	
10. 香料	0.1	
11. パラオキシ安息香酸メチル	0.25	
12. 1, 3-ブチレングリコール	8.5	
13. 精製水にて全量を100とする		

[製造方法] 成分2～9を加熱溶解して混合し、70℃に保ち油相とする。成分1及び11～13を加熱溶解して混合し、75℃に保ち水相とする。油相に水相を加えて乳化して、かき混ぜながら冷却し、45℃で成分10を加え、更に30℃まで冷却後、製品とする。

【0025】

比較例1 従来クリーム1

処方例1において、月下美人抽出物 (製造例1) をシラカバ抽出物 (一丸ファルコス) に置き換えたものを従来クリーム1とした。

【0026】

比較例2 従来クリーム2

処方例1において、月下美人抽出物 (製造例1) を精製水に置き換えたものを従来クリーム2とした。

【0027】

次に、本発明を詳細に説明するため、具体的な実験例を挙げて説明する。本発明はこれら実験例に何ら制約されるものではない。

【0028】

実験例1 線維芽細胞におけるNRG1タンパク質の検出

ヒト皮膚線維芽細胞 (NB1RGB) を10%ホルマリンにて固定後、NRG1タンパク質の免疫染色を行った。使用した一次抗体はNRG1 (R&D SYSTEMS)、二次抗体はAlexa Fluor 594 Donkey Anti-Goat IgG (H+L) (Molecular Probes) である。染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。

10

20

30

40

50

【0029】

実験結果を図1に示した。その結果、線維芽細胞において、NRG1タンパク質が検出された。従って、線維芽細胞において、確かにNRG1が発現していることが示された。

【0030】

実験例2 NRG1タンパク質のメラニン生成促進効果

メラニン生成においては、チロシナーゼ(TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1(TRP1)及びチロシナーゼ関連タンパク質2(TRP2)が主要な酵素として関与し、これら酵素の発現制御には小眼球症関連転写因子(MITF)が重要な役割を担っている。コンフルエントな状態のヒト正常メラノサイト(NHEM)に、最終濃度が100及び200ng/mLになるように調製したNRG1(PROSPEC)を添加して24時間培養後、RNAiso plus(TAKARA)を用いて総RNAの抽出を行った。総RNAを基に、リアルタイムRT-PCR法により、TYR、TRP1、TRP2及びMITF mRNA発現量の測定を行った。リアルタイムRT-PCR法にはSYBR Select Master Mix(ライフテクノロジーズ)を用い、TYR、TRP1、TRP2及びMITF用のプライマーは以下に示すものを用いた。内部標準として、 β -アクチンを用いた。リアルタイムRT-PCRの操作は定められた方法に従い、TYR、TRP1、TRP2及びMITF mRNAの発現量を内部標準である β -アクチンmRNAの発現量に対する割合として求めた。TYR、TRP1、TRP2及びMITFの発現率は、未添加のmRNA発現量に対するNRG1添加群のmRNA発現量の比率として算出した。

【0031】

TYR用のプライマーセット

TGCGGTGGGAACAAGAAATC(配列番号1)

GAAGAATGATGCTGGGCTGAGT(配列番号2)

TRP1用のプライマーセット

CGAAACACAGTGGAAAGGTTACAGT(配列番号3)

CTCCTCAGCCATTCATCAAAGACT(配列番号4)

TRP2用のプライマーセット

GGAATGCTTTGGAAAGGGTTTG(配列番号5)

AAAGCGTTTGTCCCGTTTCAG(配列番号6)

MITF用のプライマーセット

GAGGCAGTGGTTTGGGCTT(配列番号7)

AATTCTGCACCCGGGAATC(配列番号8)

 β -アクチン用のプライマーセット

CACTCTTCCAGCCTTCCCTTCC(配列番号9)

GTGTTGGCGTACAGGTCCTTG(配列番号10)

【0032】

実験結果を表1~4に示した。その結果、NRG1タンパク質は、メラノサイトにおけるTYR、TRP1、TRP2及びMITFの発現を促進した。従って、NRG1は、メラノサイトに作用してメラニン生成促進効果を有することが示された。

【0033】

【表1】

試料及び濃度	TYR/ β -アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
NRG1タンパク質 100ng/mL	146
NRG1タンパク質 200ng/mL	168

【0034】

【表 2】

試料及び濃度	TRP1/β-アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
NRG1タンパク質 100 ng/mL	156
NRG1タンパク質 200 ng/mL	159

【0035】

【表 3】

試料及び濃度	TRP2/β-アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
NRG1タンパク質 100 ng/mL	159
NRG1タンパク質 200 ng/mL	202

10

【0036】

【表 4】

試料及び濃度	MITF/β-アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
NRG1タンパク質 100 ng/mL	201
NRG1タンパク質 200 ng/mL	233

20

【0037】

実験例3 酸化ストレスによるNRG1生成促進効果

コンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞(NB1RGB)に、最終濃度が250及び500 μMになるように調製した過酸化水素(H₂O₂)を添加して24時間培養後、RNAiso plus(TAKARA)を用いて総RNAの抽出を行った。総RNAを基に、リアルタイムRT-PCR法により、NRG1 mRNA発現量の測定を行った。リアルタイムRT-PCR法にはSYBR Select Master Mix(ライフテクノロジーズ)を用い、NRG1用のプライマーは以下に示すものを用いた。内部標準として、β-アクチンを用いた。リアルタイムRT-PCRの操作は定められた方法に従い、NRG1 mRNAの発現量を内部標準であるβ-アクチン mRNAの発現量に対する割合として求めた。NRG1の発現率は、未添加のmRNAの発現量に対するH₂O₂添加群のmRNAの発現量の比率として算出した。

30

【0038】

NRG1用のプライマーセット

GCCCATCACTCCACTACTGTCA(配列番号11)

GCTTTCAGTGTTGTCCTTGCT(配列番号12)

【0039】

実験結果を表5に示した。その結果、H₂O₂添加による酸化ストレスは、NRG1の発現を促進した。従って、線維芽細胞に酸化ストレスを負荷すると、NRG1の産生が亢進されることが示された。

40

【0040】

【表 5】

試料及び濃度	NRG1/β-アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
H ₂ O ₂ 250 μM	197
H ₂ O ₂ 500 μM	241

【0041】

50

実験例4 NRG1の産生量を指標とする美白成分のスクリーニング方法

コンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞(NB1RGB)に、最終濃度が50、100及び200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製した月下美人抽出物(製造例1)及びメラニン生成抑制効果を有することが知られているシラカバ抽出物(比較例3、一丸ファルコス)を添加して24時間培養後、RNAiso plus(TAKARA)を用いて総RNAの抽出を行った。総RNAを基に、リアルタイムRT-PCR法により、NRG1 mRNA発現量の測定を行った。リアルタイムRT-PCR法にはSYBR Select Master Mix(ライフテクノロジーズ)を用い、NRG1用のプライマーは実験例3と同様のものを用いた。内部標準として、 β -アクチンを用いた。リアルタイムRT-PCRの操作は定められた方法に従い、NRG1 mRNAの発現量を内部標準である β -アクチン mRNAの発現量に対する割合として求めた。NRG1の発現率は、未添加のmRNAの発現量に対する試料添加群のmRNAの発現量の比率として算出した。

10

【0042】

実験結果を表6に示した。その結果、シラカバ抽出物はNRG1の発現に影響を及ぼさなかったが、月下美人抽出物はNRG1の発現を顕著に抑制した。従って、NRG1産生に対し、月下美人抽出物は優れた抑制効果を示した。

【0043】

【表6】

試料及び濃度	NRG1/ β -アクチン (%) (未添加を100とする)
未添加	100
月下美人抽出物 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	82
月下美人抽出物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	71
月下美人抽出物 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	65
シラカバ抽出物 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	101
シラカバ抽出物 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	102
シラカバ抽出物 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99

20

【0044】

実験例5 酸化ストレスを負荷することを特徴とする美白成分のスクリーニング方法

コンフルエントな状態のヒト皮膚線維芽細胞(NB1RGB)に、最終濃度が500 μM になるように調製した過酸化水素(H_2O_2)と同時に、最終濃度が100及び200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように調製した月下美人抽出物(製造例1)を添加した。24時間培養後、RNAiso plus(TAKARA)を用いて総RNAの抽出を行った。総RNAを基に、リアルタイムRT-PCR法により、NRG1 mRNA発現量の測定を行った。リアルタイムRT-PCR法にはSYBR Select Master Mix(ライフテクノロジーズ)を用い、NRG1用のプライマーは実験例3と同様のものを用いた。内部標準として、 β -アクチンを用いた。リアルタイムRT-PCRの操作は定められた方法に従い、NRG1 mRNAの発現量を内部標準である β -アクチン mRNAの発現量に対する割合として求めた。NRG1の発現率は、未添加のmRNAの発現量に対する試料添加群のmRNAの発現量の比率として算出した。

30

40

【0045】

実験結果を表7に示した。その結果、月下美人抽出物は酸化ストレスによるNRG1の発現亢進を抑制した。従って、酸化ストレスを負荷した時に増加するNRG1に対し、月下美人抽出物は優れた抑制効果を示した。

【0046】

【表 7】

試料及び濃度		NRG1/ β -アクチン(%) (未添加を100とする)
未添加		100
H_2O_2 500 μ M		202
H_2O_2 500 μ M+月下美人抽出物	100 μ g/mL	163
H_2O_2 500 μ M+月下美人抽出物	200 μ g/mL	156

【0047】

実験例 6 B16マウスメラノーマを用いたメラニン生成抑制試験

マウスメラノーマ由来細胞株であるB16細胞を6cmディッシュに 3×10^4 個播種し、10%FBSを含むMEM with NEAAにて5%CO₂、37条件下で5日間培養した。その時、最終濃度が50、100及び200 μ g/mLになるように調製した月下美人抽出物(製造例1)及びメラニン生成抑制効果を有することが知られているシラカバ抽出物(比較例3、一丸ファルコス)を添加した。次に、細胞をPBS(-)にて2回洗浄した後、PBS(-)1mLを加え、ラバーポリスマンにて集めた。遠心操作をして得られたペレットにPBS(-)0.5mLを加え、超音波破碎操作をしてペレットを溶解させた。タンパク量はLowry法{J. Biol. Chem., 193, 265-275(1951)}により測定した。又、1mgタンパクあたりのメラニン量を測定する場合、タンパク定量用にとった残りの細胞破碎溶液に4N水酸化ナトリウム0.5mLを加え、60で2時間反応させた後O.D.475を測定し、検量線からメラニン定量を行った。データは1mgタンパクあたりのメラニン量を算出し、試料未添加のメラニン生成量をコントロールとし、コントロールに対する試料添加時のメラニン生成量の値からメラニン生成抑制率を算出した。

【0048】

これらの試験結果を表8に示す。その結果、月下美人抽出物はメラノーマにおけるメラニン生成に影響を及ぼさなかったが、シラカバ抽出物はメラニン生成を抑制した。従って、メラノーマにおけるメラニン生成に対し、月下美人抽出物は抑制効果を示さなかった。

【0049】

【表 8】

試料及び濃度		メラニン生成抑制率 (%)
月下美人抽出物	50 μ g/mL	1.0
月下美人抽出物	100 μ g/mL	1.2
月下美人抽出物	200 μ g/mL	-0.7
シラカバ抽出物	50 μ g/mL	10.1
シラカバ抽出物	100 μ g/mL	18.8
シラカバ抽出物	200 μ g/mL	21.9

【0050】

実験例 7 使用試験

処方例1のクリーム、比較例1の従来クリーム1及び比較例2の従来クリーム2を用いて、各々女性30人(20~45歳)を対象に3カ月間の使用試験を行った。使用後、シミ及びソバカスの改善についてのアンケート調査を行って、美白効果を判定した。アンケートの評価基準は、有効なものを「優」、やや有効なものを「良」、わずかに有効なものを「可」、無効なものを「不可」として評価した。

【0051】

これらの結果を表9に示した。処方例1の月下美人抽出物を含有する本発明のクリームは優れた美白効果を示した。又、比較例1のシラカバ抽出物を含有する従来クリーム1は美白効果を示したが、処方例1の月下美人抽出物を含有する本発明のクリームよりも効果は低かった。尚、試験期間中皮膚トラブルは一人もなく、安全性においても問題なかった。

【0052】

10

20

30

40

50

【表 9】

試験品	シミの改善効果				ソバカスの改善効果			
	優	良	可	不可	優	良	可	不可
本発明のクリーム（処方例 1）	1 2	1 0	6	2	1 0	1 4	4	2
従来 of クリーム 1（比較例 1）	1 0	1 1	5	4	7	1 2	7	4
従来 of クリーム 2（比較例 2）	2	5	1 1	1 2	3	4	9	1 4

【 0 0 5 3 】

前記図 1 及び表 1 ~ 4 より、NRG1 は線維芽細胞から産生されてメラニン生成に関与していることが確認された。そして、前記表 5 より、酸化剤曝露にて NRG1 の発現が亢進されることが分かった。又、前記表 9 より、月下美人抽出物は最終的に美白効果を有する薬剤であることが認められた。しかしながら、前記表 8 より、そのメカニズムはメラノサイトのみによるものではないことが分かった。一方、前記表 6 及び 7 より、月下美人抽出物の美白効果は、真皮線維芽細胞における NRG1 の発現量と相関があることが認められた。

10

【 0 0 5 4 】

以上より、線維芽細胞における神経栄養因子 NRG1 発現量を指標とすることで美白成分のスクリーニングが可能となった。又、同様に、神経栄養因子 NRG1 の産生抑制効果を指標とすることで美白成分のスクリーニングが可能となった。

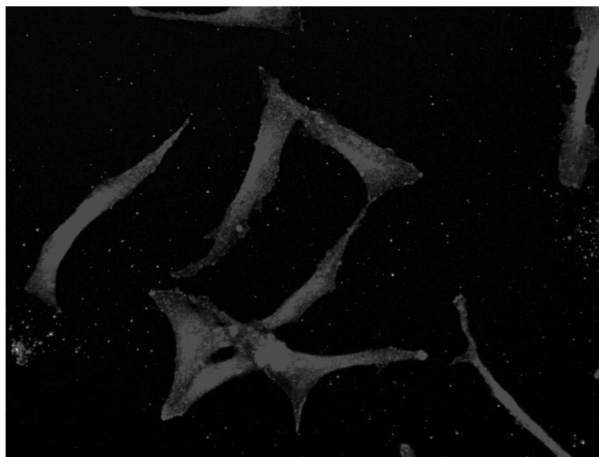
【産業上の利用可能性】

20

【 0 0 5 5 】

本発明の線維芽細胞を用いることを特徴とする美白成分のスクリーニング方法は、これまでのケラチノサイトやメラノサイトを用いる美白成分のスクリーニング方法では評価することができなかった化粧品や皮膚外用剤等に用いる美白成分の開発に用いられるものである。

【図 1】



【配列表】

0006320833000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2013/058578(WO, A1)
中国特許出願公開第101347640(CN, A)
米国特許出願公開第2013/0095053(US, A1)
特開2011-092179(JP, A)
特開2010-065009(JP, A)
J Dermatol Sci, 2010, vol.57, no.3, p.170-177
J Cell Sci, 2010, vol.123, p.3102-3111

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)