

明 細 書

発明の名称：育毛剤

技術分野

[0001] 本発明は、育毛剤に関する。さらに詳しくは、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む外用剤である育毛剤に関する。

背景技術

[0002] ヒトを始めとする哺乳動物において、育毛効果および毛種・毛質を改善する育毛剤などの外用剤の需要が伸びている。育毛効果および毛種・毛質を改善のため、毛のライフサイクルである毛周期を調節することに寄与する有効成分が提案され、育毛剤として上市されつつある。

[0003] たとえば、育毛剤の有効成分としてミノキシジルの利用が提案され（特許文献１～３などを参照。）、ヒト臨床試験を経て、ミノキシジルを有効成分とする育毛剤が上市されている。しかしながら、その医薬用途は本邦においては男性の壮年性脱毛症に限られるなど、育毛効果および毛種・毛質改善効果を所望する幅広い消費者の要望を十分に叶えるものとはなっていない。

[0004] また、育毛剤の有効成分としてchiro-イノシトールの利用が提案されている（特許文献４を参照。）。しかしながら、特許文献４に記載のchiro-イノシトールを含む外用剤である育毛剤は、インスリン抵抗性ではない対象においてのみ育毛効果が裏付けられるに留まり、投与対象者が限られている。そのため、育毛効果および毛種・毛質改善効果を所望する幅広い消費者の要望を十分に叶えるものとはなっていない。

[0005] パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンは、化粧品原材料の成分として知られている（特許文献５を参照。）。しかしながら、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの育毛効果に関する報告はない。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：米国特許第4 1 3 9 6 1 9号明細書
特許文献2：特開昭6 3－1 5 0 2 1 1号公報
特許文献3：特開昭6 3－1 4 5 2 1 7号公報
特許文献4：国際公開第2 0 1 7／1 8 8 3 9 3号
特許文献5：特許第5 0 2 8 4 7 4号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明の目的は、優れた育毛作用を有する育毛剤を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを有効成分とすることで、育毛活性を発揮させること、スカルプケア効果を発揮することおよび毛乳頭細胞のFGF-7産生促進効果を発揮させることを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0009] 上記の課題を解決するための本発明の第1の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む外用剤である育毛剤である。
- [0010] 上記の課題を解決するための本発明の第2の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの含有量が全体に対して0.001～20重量%である、本発明の第1の手段に記載の育毛剤である。
- [0011] 上記の課題を解決するための本発明の第3の手段は、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの含有量が全体に対して0.005～10重量%である、本発明の第1の手段または第2の手段に記載の育毛剤である。
- [0012] 上記の課題を解決するための本発明の第4の手段は、毛幹成長促進または

発毛に用いるための、本発明の第１～第３の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0013] 上記の課題を解決するための本発明の第５の手段は、毛幹伸長速度を向上させるために使用する、本発明の第１～第４の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0014] 上記の課題を解決するための本発明の第６の手段は、毛幹最大長を向上させるために使用する、本発明の第１～第４の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0015] 上記の課題を解決するための本発明の第７の手段は、毛幹径を増大させるために使用する、本発明の第１～第４の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0016] 上記の課題を解決するための本発明の第８の手段は、毛数を増加させるために使用する、本発明の第１～第４の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0017] 上記の課題を解決するための本発明の第９の手段は、溶液である、本発明の第１～第８の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0018] 上記の課題を解決するための本発明の第１０の手段は、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用の、本発明の第１～第９の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤である。

[0019] 上記の課題を解決するための本発明の第１１の手段は、本発明の第１～第１０の手段のいずれか１の手段に記載の育毛剤を対象に投与することを含む育毛方法である。

[0020] 上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む外用剤であるスカルプケア剤である。

[0021] 上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む外用剤であるスカルプケア剤を対象に投与することを含む頭皮症状改善方法である。

[0022] 上記の課題を解決するための本発明のその他の手段は、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む毛乳頭細胞のFGF-7産生促進剤である。

発明の効果

[0023] 本発明の手段により、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを外用剤である育毛剤の有効成分とすることで、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛における毛幹成長促進、毛幹伸長速度の向上、毛幹最大長の向上、毛幹径の増大の効果並びにスカルプケア効果が奏される優れた育毛剤、スカルプケア剤および毛乳頭細胞のFGF-7産生促進剤が提供されることとなる。

図面の簡単な説明

[0024] [図1]図1は、パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン 0.05%溶液の塗布後の、マウスの薬剤塗布部位における発毛の状態を確認した写真、及びマウスの薬剤塗布部位における毛幹長の変化を示すグラフである。グラフの縦軸は毛幹長（mm）を表す。なお、プラセボ塗布とは薬剤を含まない60%エタノールを水溶液を第一毛周期に塗布した標準的データを示す。

[図2]図2は、薬剤塗布後の毛幹径の測定結果を示す。

[図3]図3は、ヒト毛乳頭細胞におけるパルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの刺激による毛乳頭細胞の増殖促進効果を示す。

[図4]図4は、ヒト毛乳頭細胞におけるパルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの刺激によるFGF-7遺伝子発現量の変化を示す。

発明を実施するための形態

[0025] 本発明を実施するための形態について、以下に説明する。なお、本発明はこれらの例示にのみ限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内において種々の変更を加え得ることは勿論である。

- [0026] 本発明に係る外用剤である育毛剤およびスカルプケア剤の有効成分は、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニン (Palmitoyl Dipeptide-5 Diaminobutyloyl Hydroxythreonine (Palm-Lys-Val-Dab-Thr-OH)) からなる。
- [0027] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤における有効成分であるパルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの濃度は、育毛剤およびスカルプケア剤の全体に対し、0.001～20重量%である。より具体的には、0.005～10重量%である。
- [0028] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、医薬品、医薬部外品、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用の化粧品および頭皮用化粧品を含む化粧品などとし、軟膏、パップ、リニメント、ローション、外用液剤、散布剤、クリーム、ジェル、乳液、ヘアトニック、ヘアスプレー、マイクロニードルなどといった様々な態様の製剤として使用することができるが、これらに限定されるものではない。
- [0029] また、さらに、本発明の育毛効果およびスカルプケア効果を妨げない程度において、医薬品、医薬部外品、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用化粧品および頭皮用化粧品を含む化粧品などにおいて通常含有することが許容される添加物等の成分を、配合したものとしてもよい。この添加物等の成分としては、例えば賦形剤、安定剤、矯臭剤、基剤、分散剤、希釈剤、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性重合体、非イオン性重合体、エチレンオキシド・プロピレンオキシドブロック共重合体、アルコール類、乳化剤、経皮吸収促進剤、pH調整剤、保存剤、着色剤、油脂、鉱物油などの油分、保湿剤、増粘剤、ポリマー、皮膜形成剤、紫外線吸収剤、細胞賦活剤、保湿剤、無機塩、機能性ビーズ・カプセル類、シリコーン類、金属キレート剤、酸化防止剤、防腐剤、清涼剤、消臭剤、顔料、染料、香料、糖類、アミノ酸類、ビタミン類、有機酸、有機アミン、植物抽出物、粘土鉱物や各種ポリマーなどの粘度調整

剤などがあげられるが、これらに限定されるものではない。

- [0030] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、発毛、育毛、養毛などの効果を有する公知の成分を含有するものとしてもよい。
- [0031] 本発明の手段における育毛剤およびスカルプケア剤の1投与あたりの有効成分の投与量は、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の効果が奏されるように調節することができる。そして、その投与量は、例えば0.005～200mg、具体的には0.05～100mg、より具体的には0.5～10mgとすることができる。
- [0032] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の投与回数は、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の効果が奏されるよう、1回もしくは複数回とすることができる。そして、本発明の育毛剤およびスカルプケア剤の投与回数は、例えば1日あたり1～6回とすることができる。そして、具体的には1日あたり1～3回、より具体的には1日あたり1～2回とすることができる。
- [0033] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、毛幹成長促進、発毛および脱毛防止に関するものであり、好ましくは毛幹成長促進および発毛に関するものである。
- [0034] 本明細書において、「毛幹成長促進」との用語は、毛幹伸長速度を向上させること、毛幹最大長を向上させること、および／または毛幹径を増大させることを意味する。
- [0035] 本明細書において、「発毛」との用語は、毛が生えていない（表皮から外に毛幹が出ていない）または毛数の少ない部位において発毛が停止した、または発毛能力が低下した毛穴から新しい毛が生えることを促進して毛数を増加させることを意味し、詳細には、毛周期における休止期を短縮すること、および／または停止した毛周期を再開させることを意味する。
- [0036] 本明細書において、「毛幹成長促進効果を有する」とは毛幹成長促進に有利に作用することを意味し、毛幹成長促進効果を示す特質を「毛幹成長促進活性」と称する。また、「発毛効果を有する」とは発毛に有利に作用することを意味し、発毛効果を示す特質を「発毛促進活性」と称する。

- [0037] 本明細書において、「脱毛」との用語は毛穴から毛幹が脱落する現象を意味し、詳細には、細胞増殖を阻害する抑制性サイトカイン等の増加および、それらの細胞死を意味する。脱毛防止効果を示す特質を「脱毛防止活性」と称する。また、「脱毛防止効果を有する」とは、抑制サイトカインの阻害もしくは減少、および細胞死の抑制を介して、毛穴からの毛幹の脱落数が減少することを意味し、毛幹成長促進、発毛効果を示す特質とは異なる生理現象である。
- [0038] 本明細書において、「頭皮症状」とは、ふけ、頭皮の肌荒れ、頭皮のかさつき、紅斑、かゆみ、吹き出物などの症状を意味する。そして、本明細書において「頭皮症状改善」とは、ふけ、頭皮の肌荒れ、頭皮のかさつき、紅斑、かゆみ、吹き出物などの抑制又は改善を意味する。
- [0039] 本発明の育毛剤は、毛幹伸長速度または毛幹最大長を向上させるために使用することができる。そして、毛幹伸長速度については、毛周期の標準データにおける毛幹伸長速度と比較して、例えば最大110%程度向上させることができ、具体的には25～110%程度向上させることができ、より具体的には33～110%程度向上させることができる。また、毛幹最大長については、毛周期の標準データにおける毛幹最大長と比較して、例えば最大49%程度向上させることができ、具体的には1～49%程度向上させることができ、より具体的には2～49%程度向上させることができる。
- [0040] 本発明の育毛剤は、毛幹径を増大させるために使用することができる。
- [0041] 本発明の育毛剤は、毛が生えていない（表皮から外に毛幹が出ていない）または毛数の少ない部位において発毛が停止した、または発毛能力が低下した毛穴から新しい毛が生えることを促進して毛数を増加させるために使用することができる、詳細には毛周期における休止期を短縮する、および／または停止した毛周期を再開させるために使用することができる。
- [0042] 本発明の育毛剤およびスカルプケア剤は、ヒトの他、家畜や愛玩動物などの動物用（非ヒト動物用）に使用することもできる。本発明の1つの側面において、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオ

ニンを含む外用剤をヒト及び家畜や愛玩動物などの動物を含む対象に投与することを含む、育毛方法および頭皮症状改善方法が提供される。

実施例

[0043] <試験例 1 : パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンによる育毛活性評価>

[0044] 1. 材料と方法

(1) 実験動物

C57BL/6Nマウス(オス)およびBalb/c nu/nuマウス(メス)を日本エスエルシー株式会社(日本)より購入し、飼育の後に以下の実験に供した。なお、動物の飼育および試験は、関連法規、省令、および指針を遵守し、理化学研究所実験倫理審査会の承認のもとに実施した。

[0045] (2) 試薬

以下の試薬をそれぞれ用意した。

プラセボ : 60%エタノール水溶液

実施例 1 : パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン 0.05%溶液

[0046] (3) マウス背部体毛皮膚由来の皮膚試験片の作製

[0047] 抜毛後12~14日目の成長期V1皮膚を背部体毛皮膚として採取するため、7~8週齢のC57BL/6Nマウスの背部体毛皮膚採取予定部位を抜毛し、12~14日飼育した。その後、抜毛したC57BL/6Nマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後に、背部体毛皮膚採取予定部位から背部体毛皮膚を適量採取した。

[0048] 採取した皮膚は、10mM HEPES、10%牛胎児血清、および1%ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含むDMEM培地(以下、「DMEM10」という。)に浸した。採取した背部体毛皮膚を先曲がりピンセットでつまみ、滅菌用溶液に10秒浸して処理する。ポビドンヨード7%溶液処理2回、PBS(-)処理3回、DMEM10処理2回の順で、それぞれ新鮮な溶液を用いて滅菌処理を行った。滅菌処理後、清浄なDMEM10中に

浸漬した。

[0049] 滅菌処理後の背部体毛皮膚を切り分け、ブロック化する。皮膚の皮筋層に付着している透明な結合組織を曲ハサミを用いて切除し、毛群を毛流に沿って長方形の短冊状に切り分けた。その際、毛包が短軸5列になるように調整し、長軸の毛包が6列になるようにして切り分け、ブロック化した。

[0050] (4) 皮膚試験片のB a l b / c n u / n uマウスへの移植

[0051] 上記で作製した背部体毛皮膚由来の皮膚試験片を、4～6週齢のB a l b / c n u / n uマウスに移植した。

[0052] 具体的には、定法に従い、マウスに対してイソフルランによるガス麻酔を行った。次いで、マウスの背部をポビドンヨード7%溶液にて消毒した後、自然横臥位をとらせた。そして、マニーオフサルミックナイフ（マニー株式会社、日本）を用いてマウスの背部を穿刺し、皮膚表皮層から真皮層下層部に至る移植創を形成した。形成された移植創へ、背部体毛皮膚由来の皮膚試験片を、移植創の体表側に毛群が向くようにして挿入した。皮膚試験片の移植深度は、移植創上端部に毛群の上端部が露出した状態となるように調節した。次いで、背部体毛皮膚由来の皮膚試験片が移植された移植創を、ナースバン（登録商標）（株式会社サンプラネット、日本）およびサージカルテープ（スリーエム ジャパン株式会社、日本）を保護テープとして用いて被覆し、移植創を保護した。移植後5～7日で保護テープを除去し、移植した背部体毛皮膚由来の皮膚試験片の生着を目視またはデジタルマイクロスコープ（株式会社キーエンス、日本）で判定した後に経過観察を行った。

[0053] (5) 移植皮膚試験片への薬剤塗布

毛周期の1周期目は、60%エタノール水溶液をプラセボとして塗布する。上記の皮膚試験片を移植したB a l b / c n u / n uマウスに、マイクロピペットを用いて25 μ Lの60%エタノールを、皮膚試験片の生着させた左右の背部にそれぞれ塗布した。その後、ドライヤーを用いて冷風をあててエタノールを素早く乾燥させた。この作業を、マウス左右背部に各4回ずつ繰り返した。

[0054] 毛周期の2周期目以降は、上記の方法に従い、毛群移植したB a l b / c n u / n uマウスに、60%エタノール水溶液に換えて、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン溶液を塗布した。

[0055] (6) 発毛経過観察および組織学的分析

B a l b / c n u / n uマウスの皮膚試験片の移植部位から3領域をそれぞれ選択し、それら領域からそれぞれ5本の毛を選択して、発毛の状態を確認し記録した。観察と記録は、目視およびデジタルマイクロスコープ（株式会社キーエンス、日本）により行った。

[0056] 2. 結果

[0057] 薬剤ごとに、1～3日おきに毛幹の長さを計測し、経時的に変化する各時点での毛幹の長さの平均値を1つのドットとしてグラフにプロットし、同様のプロットを5匹分繰返した。結果を表1および図1に示す。

[0058] [表1]

	プラセボ塗布 (第一毛周期)	薬剤作用のデータ (第二毛周期)
毛幹成長速度(mm/日)	0.36±0.06	0.40±0.08
対標準データ比		110.45%
毛幹最大長(mm)	4.9±0.3	5.1±0.3
対標準データ比		103.27%

[0059] マウスの皮膚試験片の移植部位に、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを0.05%で含有する溶液を塗布した場合には、標準データと比較して毛幹成長速度および毛幹最大長が向上した（表1および図1を参照。）。これらの結果から、パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを0.05%で含有する溶液には、育毛活性が認められた。

[0060] <試験例2：パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンによる太毛化活性評価>

[0061] 1. 材料と方法

(1) 太毛化の計測方法

上記の試験例1において2周期目が終了した毛幹を用いて、太毛化の計測を行った。太毛化の計測には、採取した毛幹のうち、Z i g z a g毛の3本を用いた。その中心部分の太くなっている範囲を1辺 100 μ mの正方形で3か所を選択した。各選択した範囲ごとに異なる5か所をさらに選び、そのZ i g z a g毛の毛幹径を計測し、太毛化の程度を評価した。

[0062] 2. 結果

毛幹径を計測した結果を図2および表2に示す。ここで、図2および表2中の**は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

[0063] [表2]

	プラセボ塗布 (第一毛周期)	薬剤作用のデータ (第二毛周期)
毛幹径 (μ m)	16.1 $\pm$ 1.8	22.0 $\pm$ 1.6 **
増加率 (%)		137

** $p < 0.01$

[0064] 本発明の手段の有効成分であるパルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを塗布すると、対照となる60%エタノール水溶液を塗布した場合の2周期目が終了した毛幹径と比べて、明らかな太毛化が生じたことが確認された。

[0065] <試験例3：パルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンによる太毛化活性評価>

[0066] 1. 材料と方法

(1) ヒト毛乳頭細胞及び培地について

ヒト毛乳頭細胞（カタログ番号：CA602t05a、白色人種、29歳男性由来、東洋紡株式会社（日本））を購入し、プロトコールに記載されるようにして細胞を維持・培養して試験評価を行った。

[0067] (2) 薬剤

試験用薬剤として、以下の各濃度（終濃度）のパルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを含むヒト毛乳頭細胞用培地が

らなる薬剤溶液を調製し、それを使用した。

実施例 1 : 10.268375 μ M

実施例 2 : 20.53675 μ M

実施例 3 : 41.0735 μ M

実施例 4 : 82.147 μ M

実施例 5 : 164.294 μ M

実施例 6 : 328.588 μ M

[0068] (3) 試験方法

ヒト毛乳頭細胞を 1×10^3 個/ウェルとなるように、96 ウェルプレートに播種した。CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37℃) 内で1日間培養した後、ヒト毛乳頭細胞の培地を、上記の各濃度のパルミトイルジペプチドー5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを含むヒト毛乳頭細胞用培地からなる薬剤溶液に置換した。その後、細胞プレートをCO₂ インキュベーターに戻し、さらに24時間、48時間、及び72時間培養した。培養後、培養の上澄み液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (略称: PBS) で細胞を洗浄した。PBS で洗浄した後、生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク株式会社 (日本)) を10%含む培地を1ウェルあたり100 μ L 添加した。添加後、培養上澄み液の吸光度 (測定波長450 nm、参照波長620 nm) を測定した。この値をもとに、無添加対照群の細胞増殖率を100%とした際の各ウェルの細胞増殖率をそれぞれ算出した。

[0069] 2. 結果

ヒト毛乳頭細胞にパルミトイルジペプチドー5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを作用させた後の経時的な生細胞率の変化を測定し、その結果を、図3に示した。

[0070] 図3に示すように、ヒト毛乳頭細胞に対してパルミトイルジペプチドー5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン (実施例1～実施例6) を作用させると、無添加対照群に比して細胞増殖率の増加が認められた。さらに、今回検討した濃度域内においては、パルミトイルジペプチドー5 ジアミノブチ

ロイルヒドロキシトレオニンの濃度依存的に細胞増殖率が上昇することが確認された。

[0071] <試験例4：パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンによるヒト毛乳頭細胞におけるFGF-7遺伝子発現の評価>

[0072] 1. 材料と方法

(1) ヒト毛乳頭細胞及び培地について

上記試験例3と同様にして、ヒト毛乳頭細胞を維持・培養して試験評価を行った。

[0073] (2) 薬剤

試験用薬剤として、以下の各濃度（終濃度）の薬剤溶液を調製し、使用した。

比較例1：アデノシン 100 μ M

実施例1：パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン 1 μ M

実施例2：パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン 10 μ M

実施例3：パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン 300 μ M

[0074] (3) 試験方法

ヒト毛乳頭細胞を 6×10^3 個/ウェルとなるように、24ウェルプレートに播種した。CO₂インキュベーター（5%CO₂、37℃）内で、1日間培養後、各試験用薬剤を含む培地に置換した。その後、細胞プレートをCO₂インキュベーターに戻し、さらに24時間培養した。

[0075] 培養後、各ウェルより、全RNAを抽出、回収して、それをcDNAに逆転写した。調製したcDNAを用いて、リアルタイムPCR法にてFGF-7遺伝子の発現を測定した。内部標準としてGAPDH遺伝子を用い、陰性対照群との相対値としてFGF-7遺伝子の発現量を算出した。

[0076] 細胞からの全RNAの回収にはFast Gene RNA Basic

Kit (カタログ番号: FG-80250、日本ジェネティクス株式会社 (日本)) を使用した。ウェルあたり 300 μ L の溶解バッファー RL を添加し、ピペティングにて細胞を溶解した。細胞溶解液に 70% エタノールを 300 μ L 添加し、ピペティングにて混合した。サンプル溶液を Fast Gene RNA binding column に添加し、10000 g で 1 分間、室温で遠心した。カラムを通過したろ液をコレクションチューブから廃棄し、Fast Gene RNA binding column を元のコレクションチューブに戻した後、600 μ L の洗浄バッファー RW1 を Fast Gene RNA binding column に加え、10000 g で 1 分間、室温で遠心した。Fast Gene RNA binding column を新しいコレクションチューブに移してセットし、700 μ L の洗浄バッファー RW2 を Fast Gene RNA binding column に加え、10000 g で 1 分間、室温で遠心した。Fast Gene RNA binding column を新しいコレクションチューブに移してセットし、15000 rpm で 1 分間、室温で遠心した。Fast Gene RNA binding column を新しいコレクションチューブに移してセットし、50 μ L の溶出バッファー RE を Fast Gene RNA binding column のメンブレンの中央に添加し、10000 g で 1 分間、室温で遠心し、精製した RNA を回収した。回収した RNA の濃度を NanoDrop Lite (カタログ番号: ND-LITE、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) にて測定し、-80°C にて次の cDNA 化作業まで保存した。

[0077] cDNA の合成には Fast Gene scriptase II cDNA Synthesis 5X Ready Mix (カタログ番号: NEL64、日本ジェネティクス株式会社 (日本)) を使用した。新しいチューブに生成した全 RNA の濃度が 20 ng/mL になるように、RNase Free Water で希釈し、このサンプル溶液 16 μ L に Fast Gene scriptase II cDNA synthesis 5

× Ready Mixを4 μ L添加し、ボルテックスにて攪拌した。Mini Ampサーマルサイクラー（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を用い、25℃で10分間、42℃で60分間、85℃で5分間インキュベートし、cDNAを合成した。

[0078] 上記の方法にて合成したcDNAをリアルタイムPCRに用いた。96ウェルプレートの所定のウェルに、各cDNA template 希釈液を添加し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（カタログ番号：QPS-201、東洋紡株式会社（日本））とプライマーを添加して混合し、QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System（カタログ番号：4485693、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）にて遺伝子発現を解析した。PCR反応として、95℃5秒間、60℃30秒間を40サイクル行った。

[0079] 試験に使用したFGF-7遺伝子に特異的なプライマー及び内部標準としたGAPDH遺伝子に特異的なプライマーを以下に示す。

FGF-7遺伝子発現検出用プライマー

順方向：gagagaaaatccttctgcctgttg（配列番号1）

逆方向：cctggtgcaacttgagcctt（配列番号2）

GAPDH遺伝子発現検出用プライマー

順方向：catccctgcctctactggcgctgcc（配列番号3）

逆方向：ccaggatgcccttgagggggccctc（配列番号4）

[0080] 以下のようにして各遺伝子の相対発現量を算出した。

各遺伝子の増幅曲線と閾値線との交点より、Ct値（PCRサイクル数）を算出した。目的遺伝子のCt値より内部標準GAPDH遺伝子のCt値で除した値が相対発現量となる。

[0081] 2. 結果

ヒト毛乳頭細胞にパルミトイルジペプチド-5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンを用いた24時間作用させた後のFGF-7遺伝子の発現量の変化を測定し、その結果を図4に示した。ここで、図4中の**は $p < 0.01$

で有意であることを示す。

- [0082] 図4に示すように、ヒト毛乳頭細胞に対してパルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン（実施例1、2）を24時間作用させると、無添加対照群に比してFGF-7遺伝子発現量が上昇することが確認された。そして、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニンの添加量が増えると、FGF-7遺伝子発現量はアデノシン（比較例1）を作用させた場合よりも大きくなることが確認された。

産業上の利用可能性

- [0083] 本発明の手段により、外用剤である育毛剤の有効成分として、パルミトイルジペプチドー5ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを用いるものとすることで、頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛などの毛における毛幹の成長促進効果、毛幹伸長速度の向上効果および毛幹最大長の向上効果、スカルプケア効果および毛乳頭細胞のFGF-7産生促進剤がを奏する新たな育毛剤およびスカルプケア剤を提供することが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンを含む外用剤である育毛剤。
- [請求項2] パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの含有量が全体に対して０．００１～２０重量％である、請求項１に記載の育毛剤。
- [請求項3] パルミトイルジペプチドー５ジアミノブチロイルヒドロキシスレオニンの含有量が全体に対して０．００５～１０重量％である、請求項１または請求項２に記載の育毛剤。
- [請求項4] 毛幹成長促進または発毛に用いるための、請求項１～請求項３のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項5] 毛幹伸長速度を向上させるために使用する、請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項6] 毛幹最大長を向上させるために使用する、請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項7] 毛幹径を増大させるために使用する、請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項8] 毛数を増加させるために使用する、請求項１～請求項４のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項9] 溶液である、請求項１～請求項８のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項10] 頭髮、須毛、眉毛および／または睫毛用の、請求項１～請求項９のいずれか１項に記載の育毛剤。
- [請求項11] 請求項１～請求項１０のいずれか１項に記載の育毛剤を対象に投与することを含む育毛方法。